

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. med. H. Raettig

ORALE IMPFUNG
MIT INAKTIVIERTEN DYSPEPSIECOLI-BAKTERIEN
BEI MENSCH UND TIER

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Burkhard Lietz
aus Berlin

1969

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor : Professor Dr. med. H. Raettig

ORALE IMPFUNG

MIT INAKTIVIERTEN DYSPEPSIECOLI-BAKTERIEN

BEI MENSCH UND TIER

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Burkhard Lietz

aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Herbert L a x

Referent: Professor Dr.med. Hansjürgen R a e t t i g

Korreferent: Professor Dr.med. Günter S t ü t t g e n



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 17. 11. 1969

Lietz

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	4
1. Versuchstiere	4
2. Impfstoff	4
3. Immunisierungsart	4
4. Infektion der Mäuse	5
5. Hämagglutinationstechnik	5
6. Herstellung einer Autovakzine	7
C. Ergebnisse	8
1. Tierversuche	8
1.1 Spezifische Immunisierung	8
1.2 Unspezifische Immunisierung	15
1.3 Serologische Untersuchungen	20
2. Serologische Untersuchung auf Antikörper gegen Dyspepsiecoli-Bakterien beim Menschen	25
3. Selbstversuch und Freiwillige	28
4. Versuche an Kindern	29
5. Kasuistik	36
D. Diskussion	37
E. Zusammenfassung	59
F. Literatur	61

A. Einleitung

Während Veröffentlichungen über die orale Immunisierung mit inaktivierten Keimen bei Typhus, Ruhr und Cholera verhältnismäßig zahlreich sind, war bis vor kurzem auf dem Gebiet der oralen Impfung mit Colibakterien relativ wenig gearbeitet worden, wie die Zusammenstellungen von RAETTIG (33) und BREUEL (3) zeigen. Auch handelte es sich dann überwiegend um Versuche, in denen die Colikeime in Kombination mit Ruhr-, Typhus-, Paratyphus- und Proteusbakterien als Mischimpfstoff verwendet wurden. So konnten als erste LUMIERE und CHEVROTIER 1914 eine Immunität nach oraler Immunisierung mit einem hitzeinaktivierten Impfstoff aus Typhus-, Paratyphus- und Colistämmen bei Kaninchen und Meerschweinchen nachweisen, nachdem sie die Tiere intravenös mit lebenden Erregern belastet hatten (15).

In den 20er Jahren wurden von PETERSON, ALISSOFF und WEDENJAPIN (28), sowie von DOMINGO und VIDAL (5) und GOLOVANOFF (6) weitere Tierversuche unternommen, eine wirklich sichere Aussage über eine Schutzwirkung der oralen Impfung mit inaktivierten Colibakterien kann aber wegen der geringen Zahl der jeweils benutzten Versuchstiere nicht abgelesen werden.

1935 erzielten NAKAGAWA und SHAKUDO in Infektionsbelastungsversuchen an Meerschweinchen eine beinahe doppelt so hohe Immunisierungswirkung, wenn sie inaktivierte Colikeime oral anstelle subkutan verabfolgten (22). In der Folgezeit wurde dann von TORIKATA und SHAKUDO (45) und TORIKATA und IMAIZUMI (44) versucht, die Wirkungsweise einer oralen Impfung mit inaktivierten Colibakterien zu klären. Zum gleichen Problem unternahm GWAN 1938 Versuche an Kaninchen (8,9). Auf die Ergebnisse dieser Versuche wird in

der Diskussion noch ausführlicher eingegangen werden.

In den letzten Jahren hat sich die Forschung mit der oralen Impfung gegen die Colidyspepsie mit inaktivierten Dyspepsiecoli(DC)-Bakterien oder Extrakten aus ihnen intensiver beschäftigt. Hierbei haben die Arbeiten von LODENKÄMPER (13), PIRINGER (29), STELLMACHER und MÜLLER (42), sowie die von OCKLITZ, MOCHMANN und Mitarbeitern (17-21,24-27) weiterführende Erkenntnisse gebracht. Durch ausgedehnte Versuchsreihen treibt besonders die Arbeitsgruppe um OCKLITZ und MOCHMANN die Forschung voran.

In dieser Arbeit nun soll die Wirkung einer oralen Impfung mit einem Monoimpfstoff aus inaktivierten Dyspepsiecoli-Bakterien untersucht werden; denn unter den Erkrankungen, die von Colikeimen hervorgerufen werden, spielt die Colidyspepsie wegen ihrer oft schweren Verlaufsform und ihrer hohen Infektiosität eine besondere Rolle. Wie man annimmt, werden etwa $\frac{1}{3}$ bis $\frac{2}{3}$ aller akuten Ernährungsstörungen durch DC-Bakterien hervorgerufen, wobei Säuglinge bis zu 4 Monaten neben Frühgeborenen und vorgeschädigten Kindern hauptsächlich betroffen sind. Besonders gefürchtet ist das endemische Auftreten der DC-Enteritis in Kinderkrankenhäusern, Säuglings- und Entbindungsheimen, in denen die Infektion bedingt durch Verbreitung der Keime auf aerogenem Wege, durch Schmierinfektionen, Nahrungsmittelvergiftung und kranke oder symptomlose Keimträger latent vorhanden ist. So dürfte auch der Anteil an Hospitalerkrankungen, verursacht durch DC-Bakterien, ziemlich hoch sein. BRAUN berichtet, daß nach Absetzen der Therapie mit Antibioticis und anderen Chemotherapeuticis eine Keimausscheiderquote von 20 bis 30% bestehen bleibt und dadurch die Gefahr einer erneuten Ausbreitung der Infektion sehr groß ist (2).

Da aber bislang die Therapie mit diesen Pharmaka recht erfolgreich schien, bestand nicht die Notwendigkeit einer prophylaktischen oder therapeutischen Impfung. Doch wird

in letzter Zeit eine immer mehr zunehmende Resistenz der Erreger beobachtet. Als ein Beispiel unter vielen mag der Bericht aus einem Frankfurter Kinderkrankenhaus gelten (31). Hier war die Endemie, ausgelöst durch den DC-Stamm O 127 : B 8 trotz sorgfältiger prophylaktischer Maßnahmen nach mehr als 12 Monaten noch nicht völlig erloschen. Oft wurde ein sehr schweres Krankheitsbild mit septischen Temperaturen und Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt bis zur Toxikose beobachtet. Als Komplikationen stellten sich Otitiden und Pneumonien ein; die Letalität betrug 10%. Schwierigkeiten in der Therapie wurden auch hier als Ursache des schweren Krankheitsbildes angegeben.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen stellen eine Vorarbeit für eine orale Schutzimpfung gegen DC-Infektionen dar. Dazu wurde an der weißen Maus die Wirksamkeit der oralen Immunisierung mit DC-Bakterien getestet und versucht, die Frage zu klären, ob bei lokaler Anwendung des Antigens die Immunität breiter wird. Wir berichteten über diese Tierversuche bereits an anderer Stelle, hier soll auf sie im Zusammenhang mit Versuchen beim Menschen noch einmal ausführlich eingegangen werden (12). Bei den Versuchen am Menschen sollte geprüft werden, ob es nach oraler Verabreichung eines inaktivierten Impfstoffes zu einer immunologischen Reaktion kommt. In Verbindung mit den Testversuchen an Erwachsenen und Kindern wurde die Frage nach dem normalen Antikörperbestand des menschlichen Serums aufgeworfen. Ihr wurde an einer größeren Anzahl von Blutseren nachgegangen. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen verwerteten wir bei einem an einer Coliinfektion Erkrankten, indem wir ihn oral mit einer Autovakzine impften.

B. Material und Methoden

1. Versuchstiere

In allen Versuchen wurden NMRI-Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet mit einem durchschnittlichen Gewicht von 16 g bei Versuchsbeginn. Die Mäuse wurden zu je 25 - 30 Tieren in Plastik-Käfigen gehalten, sie bekamen das Trockenfutter "Altromin" und Leitungswasser. Ebenso wurde mit den Kontrolltieren verfahren.

2. Impfstoff

Zur Immunisierung eines Teils der weißen Mäuse wurde ein Impfstoff aus dem Stamm E. coli 2380 (ROWLEY) hergestellt, der Titer wurde auf $3,1 \times 10^9$ Keime/ml eingestellt. Die Inaktivierung der Colibakterien erfolgte im Wasserbad bei 60°C für 1 1/2 Stunden, danach wurde eine Sterilitätskontrolle unternommen.

Ein anderer Teil der Mäuse erhielt einen Coli-Impfstoff der Behring-Werke mit der Antigenformel O 125 : B 15 : H 19, der Titer betrug hierbei 5×10^{11} Bakterien/ml.

In weiteren Versuchen wurde dieser Impfstoff in Form von Pulver Erwachsenen und Kindern eingegeben. Eine Kapsel enthielt bei diesen Versuchen 15,2 mg inaktivierter und lyophilisierter E. coli-Keime des Stammes O 125 : B 15, als Füllmaterial kamen je 50,0 mg Maisstärke und Milchsucker zur Anwendung.

3. Immunisierungsart

Ein Teil der Mäuse erhielt täglich je 0,25 ml des Impfstoffes E. coli 2380, der andere Teil den Behring-Impfstoff; in beiden Fällen betrug die Dauer der Behandlung 10 Tage. Es wurde oral mit einer Sonde geimpft.

Ein Erwachsener nahm 10 Tage lang vom Impfstoff der Behring-Werke täglich 2 Kapseln ein (insgesamt 20 Kapseln), zwei weitere Personen schluckten im Abstand von 2 Tagen 5mal je eine Kapsel (insgesamt 5 Kapseln pro Person).

An weiteren Versuchen waren 9 Kinder beiderlei Geschlechts im Alter von 0,5 bis 7,1 Jahren beteiligt. Es wurde ihnen 10 Tage lang täglich 1 Kapsel gegeben. In allen Fällen wurde der Impfstoff morgens 1/2 Stunde vor Nahrungsaufnahme eingenommen. Zur Verabreichung wurde der Inhalt der Kapsel auf einem Teelöffel in etwas Milch oder Wasser aufgelöst und geschluckt.

Die Immunisierung der weißen Mäuse und der Versuchspersonen wurde ausschließlich mit nichtvermehrungsfähigen Bakterien vorgenommen.

4. Infektion der Mäuse

Jede immunisierte Maus und jede Kontrollmaus wurde am 7. Tage nach der letzten oralen Impfung mit 0,1 ml des virulenten E. coli 2380-Stammes intraperitoneal infiziert. Zur Prüfung der Unspezifität sind somit auch die mit dem Behring-Impfstoff immunisierten Mäuse mit dem heterologen Stamm E. coli 2380 infiziert worden. In Vorversuchen war die Infektionsdosis auf 0,1 ml = 10^9 Keime eingestellt worden. Bei i. p.-Gabe dieser Menge ergab sich eine 50%ige Letalität, bei oraler Applikation war keine Sterblichkeit zu verzeichnen.

5. Hämagglutinationstechnik

Mit Hilfe des indirekten Hämagglutinationstestes nach BRODHAGE (4) wurden spezifische Antikörper nachgewiesen, und zwar bei sämtlichen Humansenen gegen den Dyspepsie-coli-Stamm K 70 (CANIONI) mit der Antigenformel

O 125 : B 15 : H 19

und bei Mäuseseren gegen den Stamm E. coli 2380 (ROWLEY) mit der Formel

O 111 : B 4 : H 12.

Von 9 Kindern und 3 Erwachsenen, die an dem Immunisierungsversuch teilnahmen, wurden unmittelbar vor und nach oraler Impfung, sowie 10 und in manchen Fällen auch 20 Tage später

jedes Mal einige cm³ Venenblut zur Serumgewinnung entnommen. Die Gesamtzahl der untersuchten Seren betrug hierbei 41.

Weiterhin wurden 50 Schwangerenserum und 55 Seren von männlichen Blutspendern zur Feststellung des Normaltiters getestet.

Die Seren von insgesamt 61 Mäusen wurden durch Herzpunktion gewonnen.

a) Antigenherstellung

Das Bakteriengemisch wird mit Harnstoff versetzt, für 5 Tage in den Brutschrank gegeben und anschließend dialysiert. Das Antigen gewinnt man nach einstündigem Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge; es ist bis zum Gebrauch bei -26° C aufzubewahren.

b) Behandlung des Serums

Das Serum wurde vom Blutkuchen getrennt, dann zentrifugiert und abpipettiert. Die Inaktivierung erfolgte im Wasserbad bei 56° C/30 Minuten. Anschließend wurden 10 Teile Serum mit 1 Teil frischgewaschener Hammelblut-Erythrocyten versetzt, aufgeschüttelt und im Brutschrank 2 Stunden lang bei 37° C aufbewahrt. Nach der Absättigung wurde zentrifugiert und der Überstand für die Weiterverarbeitung abgesaugt.

c) Sensibilisierung der Hammelblut-Erythrocyten (H.E.)

0,85 ml frischgewaschener H.E. wurden zu 20,0 ml gepufferter NaCl-Lösung (pH 7,2) und 5,0 ml Antigenlösung gegeben. Die Mischung wurde nach kräftigem Schütteln 2 Stunden lang bei 37° C im Brutschrank stehengelassen. Dann wurden die derart behandelten Erythrocyten abzentrifugiert, 3- bis 4mal in gepufferter NaCl-Lösung gewaschen und schließlich in 125 ml NaCl (pH 7,2) aufgenommen.

d) Ansatz der Testreihen

Vor dem Hauptversuch wurde ein Kontrollversuch mit 2 Seren bekannten Antikörpertiters und dem Antigen vorgenommen; es sollte geprüft werden, ob das Antigen wirksam

ist. Dazu werden die beiden Kontrollseren ab 1 : 20 aufsteigend verdünnt, und zwar mindestens noch eine Stufe weiter als der zu erwartende Endtiter. Hinzugegeben wurden die mit dem Antigen sensibilisierten H.E. Gleichzeitig erfolgte die Kontrolle der beiden Seren: sie wurden auf ungefähr 1/3 der Ausgangsverdünnung eingestellt (von 1 : 20 auf 1 : 60) und mit normalen H.E. versetzt. Außerdem wurde das Antigen noch in folgenden Ansätzen getestet: es wurde einmal zu einem positiven Serum als positive Kontrolle, zu einem negativen als negative Kontrolle und zu NaCl (pH 7,2) beigegeben. Nach dreistündiger Aufbewahrung im Brutschrank bei 37° C wurde der Titer abgelesen.

Erst nachdem die Kontrollen einwandfrei waren, wurde das zu untersuchende Serum geprüft: es wurden in 2 Reihen je 0,3 ml Patienten- bzw. Mäuseserum ab 1 : 2 mit gepufferter NaCl-Lösung geometrisch um 2 bis 3 Stellen über die zu erwartende Endtiterhöhe hinaus verdünnt. In jedes Röhrchen der einen Reihe wurden 0,3 ml der Antigen-sensibilisierten Erythrocytenaufschwemmung A gegeben, zu der zweiten die Aufschwemmung B (es handelte sich hierbei um ein und dasselbe Antigen, A und B unterschieden sich nur durch den Zeitpunkt ihrer Herstellung). Verdünntes Serum versetzt mit normalen H.E. diente als Kontrolle. Die Ablesung der Hämagglutination erfolgte bei abgeblendeter Lampe nach 3 Stunden/37° C. Der Titer des Serums wurde durch diejenige Verdünnungsstufe bestimmt, bei der noch Teilchen deutlich sichtbar waren. Antigen A und B führten meist zu dem gleichen Ergebnis; andernfalls kam der höhere Titer zur Auswertung. Nach 24stündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde noch einmal abgelesen.

6. Herstellung einer Autovakzine

Im Blut eines 65jährigen Patienten mit der Diagnose Pyonephrose bei Solitärniere und Urämie stellte man lactosensschwache Colibakterien fest. Zur therapeutischen oralen Impfung wurden 300 ml Impfstoff benötigt. Der Colistamm

wurde aus dem Blut gezüchtet, in 15 Röhrchen mit Nährbouillon überimpft und 24 Stunden lang bei 37° C bebrütet. Je 5 bis 10 ml wurden aus jedem Röhrchen entnommen und auf 15 große sterile Agarschalen gebracht. Nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 37° C wurden die Bakterienrasen mit je 10 ml NaCl (pH 7,2) abgeschwemmt; die Ausbeute betrug etwa 20 ml pro Schale bzw. 300 ml insgesamt. In einer Verdünnungsreihe wurde die Keimzahl bestimmt und zu $3,3 \times 10^{10}$ Keimen/ml eingestellt. Die Inaktivierung der Bakterien erfolgte im Wasserbad bei 60° C 1 1/2 Stunden lang. Anschließend wurde eine Sterilitätskontrolle vorgenommen.

Der Patient erhielt täglich einen Teelöffel der Autovakzine, das entspricht etwa 15×10^{10} Keimen.

C. Ergebnisse

1. Tierversuche

1.1 Spezifische Immunisierung

Die Wirkung der oralen Immunisierung wurde am Vergleich der Todesfälle gemessen, die bei den immunisierten Mäusen und den Kontrolltieren während einer Zeitspanne von 6 Tagen nach der Infektion auftraten. Danach kam es praktisch zu keinem weiteren Absterben mehr.

Zur Prüfung einer spezifischen Schutzwirkung bei der oralen Impfung wurden in den Versuchen 1 bis 6 insgesamt 294 Mäuse mit dem Stamm E. coli 2380 oral immunisiert und danach mit dem gleichen Stamm i.p. infiziert. Als Kontrolle diente in den 6 Versuchen die gleiche Anzahl von Mäusen. In Tabelle 1 sind die zur Frage der Spezifität durchgeführten Tierversuche zahlenmäßig zusammengestellt.

Tabelle 1

Die Daten für die Versuche mit spezifischer oraler Immunisierung mit hitzeinaktivierten Dyspepsiecoli-Bakterien des Stammes 2380 (O 111 : B 4 : H 12) und intraperitonealer Infektionsbelastung mit dem homologen Stamm.

Vers. Nr.	Spezifisch geimpfte Mäuse			Kontrollen			Wirkungs- index
	n	davon gestorben		n	davon gestorben		
		abs.	%		abs.	%	
1	2	3	4	5	6	7	8
1	49	3	6,1	51	42	82,4	92,6
2	49	5	10,2	41	30	73,2	86,1
3	47	13	27,7	50	36	72,0	61,6
4	64	4	6,2	58	47	81,1	92,3
5	54	30	55,6	53	45	84,9	34,6
6	31	5	16,1	41	27	65,9	75,5
Summe:	294	60	20,4	294	227	77,2	73,6

In jedem einzelnen Versuch liegt die Endmortalität bei den immunisierten Tieren niedriger als bei den entsprechenden Kontrollen. Aus den 6 durchgeführten Versuchsreihen sollen im folgenden 3 von ihnen ausführlicher dargestellt werden. Das beste Ergebnis wurde in Versuch Nr. 1 erzielt: von 51 ungeimpften Kontrolltieren starben 82,4%, während nur 6,1% der 49 Immuntiere der intraperitonealen Infektion erlagen. Abb. 1 zeigt hierfür die graphische Darstellung. Die mehr als 10mal höhere Sterbequote bei den ungeschützten Tieren spiegelt sich in dem hohen Wirkungsindex der Impfung von 92,6 wider.

Ein mittelguter Impfschutz ließ sich im Versuch Nr. 6 zeigen: hier betrug die Mortalität bei den Kontrollen 65,9% und die bei den Immuntieren 16,1%, das entspricht einem Wirkungsindex von 75,5 (Abb. 2).

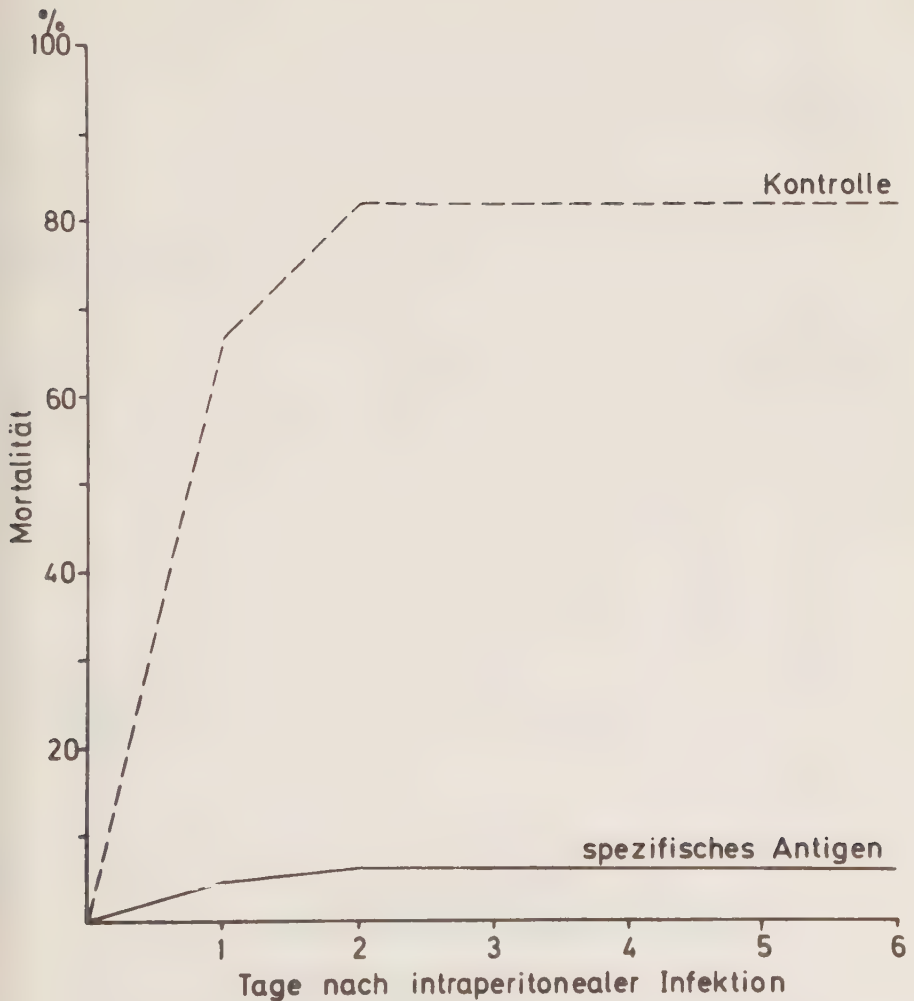


Abb. 1. Anstieg der Mortalität nach i.p. Infektion mit dem DC-Stamm 2380 bei 49 oral mit hitzeinaktivierten DC-Bakterien 2380 spezifisch immunisierten Mäusen (ausgezogene Kurve) und 51 nichtgeimpften Kontrollmäusen (gestrichelte Kurve). Einzelversuch Nr. 1.

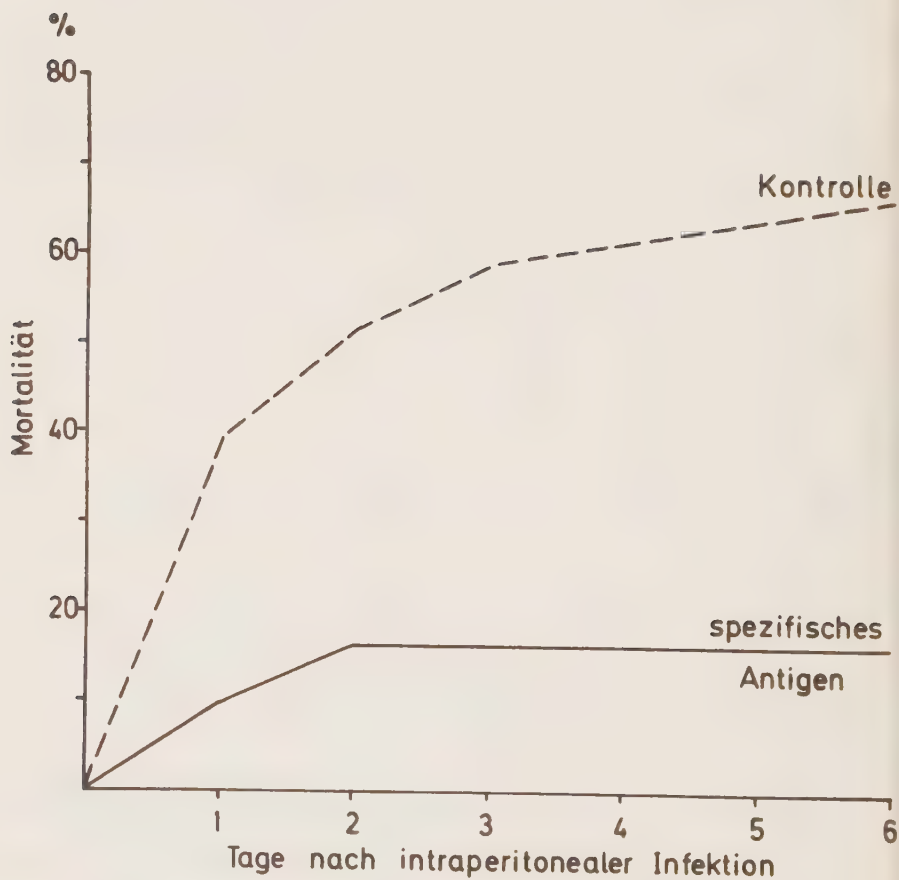


Abb. 2. Anstieg der Mortalität nach i.p. Infektion mit dem DC-Stamm 2380 bei 31 oral mit hitzeinaktivierten DC-Bakterien 2380 spezifisch immunisierten Mäusen (ausgezogene Kurve) und 41 nichtgeimpften Kontrollmäusen (gestrichelte Kurve). Einzelversuch Nr. 6.

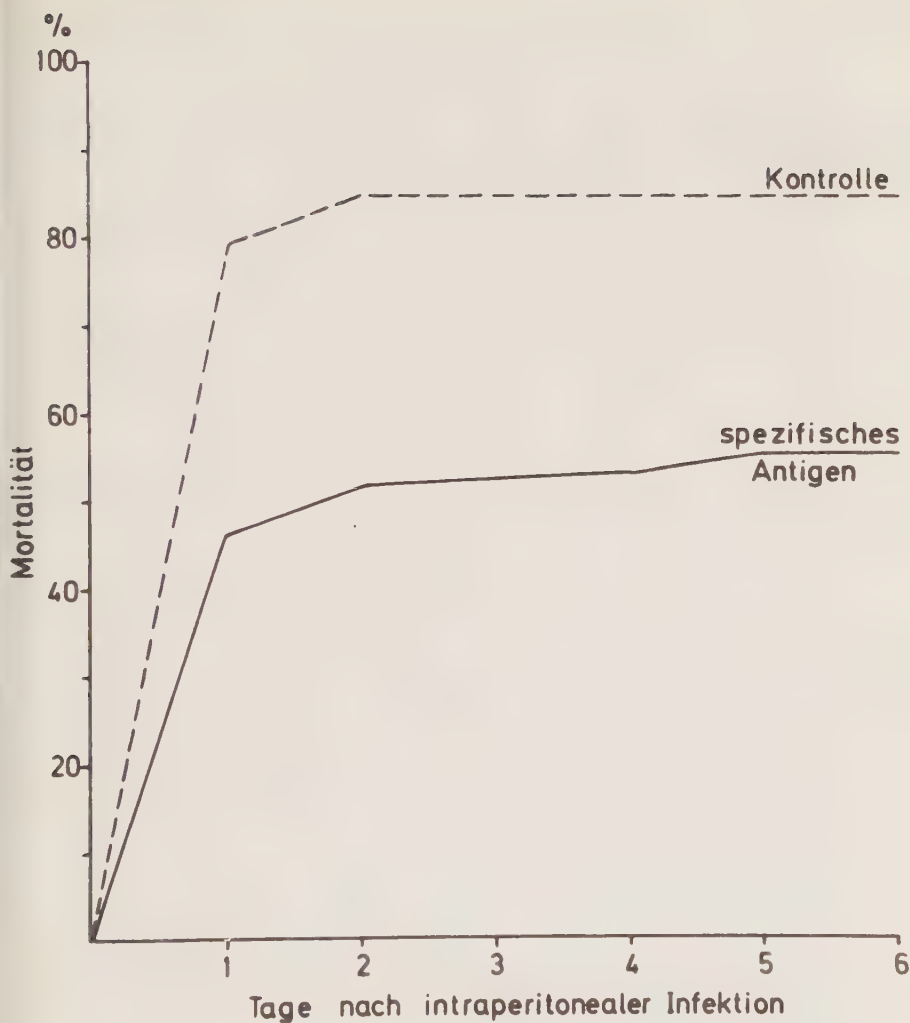


Abb. 3. Anstieg der Mortalität nach i.p. Infektion mit dem DC-Stamm 2380 bei 54 oral mit hitzeinaktivierten DC-Bakterien 2380 spezifisch immunisierten Mäusen (ausgezogene Kurve) und 53 nichtgeimpften Kontrollmäusen (gestrichelte Kurve). Einzelversuch Nr. 5.

In Abb. 3 ist der Versuch Nr. 5 dargestellt. Verglichen mit den ersten beiden Abbildungen ist eine deutliche Annäherung der Mortalitätskurve der Immuntiere an die der Kontrolltiere zu sehen. Es war das schlechteste Versuchsergebnis, von 53 ungeimpften Tieren starben 84,9%, von 54 geimpften Tieren 55,6%, der Wirkungsindex betrug hierbei nur 34,6.

Möglicherweise handelt es sich hier um einen "Ausreißer". Das Resultat dieses Versuches könnte aber andererseits folgendermaßen erklärt werden:

Die Mortalität der Kontrolltiere war hier die höchste sämtlicher Versuchsreihen und läßt damit an eine zu hohe Infektionsbelastung denken, so daß bei den oral immunisierten Tieren der Impfschutz durchbrochen wurde. Dies hat sich dann auf die Sterbequote der Immuntiere ausgewirkt.

Die Zusammenfassung aller 6 Versuche, die zur Klärung der Frage eines spezifischen Impfschutzes unternommen wurden, ist in Abb. 4 dargestellt. Es handelt sich dabei um ein Tierkollektiv von 294 oral immunisierten Mäusen und 294 Kontrollmäusen aus den in Tab. 1 aufgeführten 6 Einzelversuchen. Schon am ersten Tage nach der Infektion ist ein großer Unterschied in der Mortalität zu verzeichnen, es starben fast 4mal so viel nichtimmunisierte wie immunisierte Tiere. Die Endmortalität am 6. Tage post infectionem betrug bei den Immuntieren 20,4%, bei den Kontrolltieren 77,2%, und der durchschnittliche Wirkungsindex aller 6 Versuche war 73,6.

Dieses Ergebnis ist mit der statistischen Echtheit der Differenz $E^* = 5,2$ (nach KOLLER (11)) hochgradig gesichert und zeigt die gute Schutzwirkung einer oralen Impfung mit inaktivierten DC-Bakterien gegenüber einer homologen intraperitonealen Infektion an.

* Statistische Echtheit der Differenz $E = \frac{D_b}{D_z} = 5,2$

D_b = beobachtete Differenz zwischen der Mortalität der Kontrolltiere und der Immuntiere = 56,8%

D_z = größte Zufallsdifferenz = 11,0%

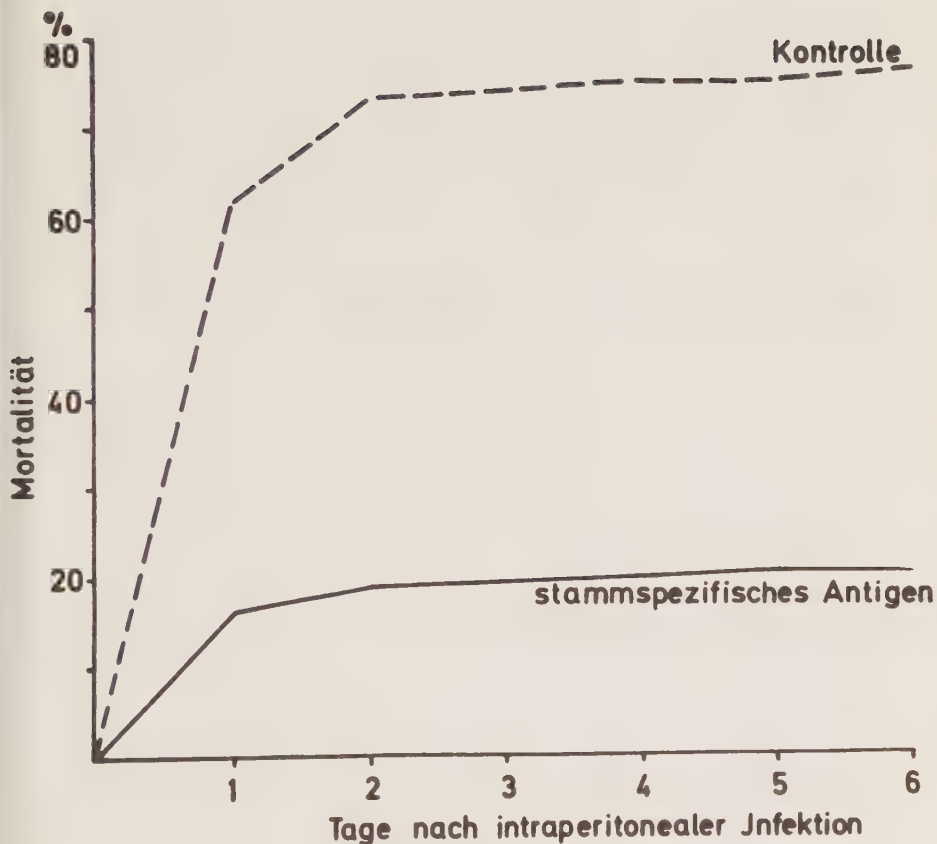


Abb. 4. Anstieg der Mortalität nach i.p. Infektion mit dem DC-Stamm 2380 bei 294 oral mit hitzeinaktivierten DC-Bakterien 2380 spezifisch immunisierten Mäusen (ausgezogene Kurve) und 294 nichtgeimpften Kontrollmäusen (gestrichelte Kurve). Zusammenfassung der Versuche Nr. 1 - 6.

1.2 Unspezifische Immunisierung

In gleichzeitig unternommenen 4 Versuchsreihen erhielten 200 Mäuse den Impfstoff der Behring-Werke, der aus dem DC-Stamm 0 125 : B 15 hergestellt worden war, zur oralen Immunisierung. Als Kontrolle dienten dieselben Mäuse wie in den vorher beschriebenen Versuchen Nr. 3 - 6. Um eine eventuelle unspezifische Wirkung der Impfung zu testen, wurden die Tiere nicht mit dem homologen Stamm infiziert, sondern mit dem Stamm E. coli 2380 intraperitoneal belastet.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse, die zur Frage eines unspezifischen Impfschutzes erzielt wurden.

Tabelle 2

Die Daten für die Versuche mit nichtspezifischer oraler Immunisierung mit inaktivierten Dyspepsiecoli-Bakterien (0 125 : B 15 : H 19) und intraperitonealer Infektionsbelastung mit dem heterologen Dyspepsiecoli-Stamm 2380 (0 111 : B 4 : H 12).

Vers. Nr.	unspezifisch geimpfte Mäuse			Kontrollen			Wirkungs- index
	n	davon gestorben		n	davon gestorben		
		abs.	%		abs.	%	
1	2	3	4	5	6	7	8
3	49	31	63,3	50	36	72,0	12,1
4	61	40	65,6	58	47	81,1	19,1
5	52	37	71,2	53	45	84,9	16,2
6	38	9	23,7	41	27	65,9	64,0
Summe	200	117	58,5	202	155	76,7	23,8

Die Endmortalität bei den so immunisierten Mäusen lag auch hier in jedem der 4 Einzelversuche niedriger als bei den entsprechenden Kontrolltieren. Bevor das Ergebnis zusammen-

gefaßt dargestellt wird, sollen zwei der vier Versuchsreihen einzeln besprochen werden.

Das beste Ergebnis brachte der Versuch Nr. 6: von den 38 unspezifisch immunisierten Tieren starben 23,7%, während 65,9% der 41 Kontrolltiere nicht überlebten. Die Abb. 5 zeigt die graphische Darstellung: es besteht ein deutlicher Abstand zwischen den beiden Mortalitätskurven, der Ausdruck für den guten Impfschutz ist. Der Wirkungsindex betrug 64,0 und erreicht damit ein mittleres Ergebnis der Versuchsreihen zur spezifischen Immunisierung.

Am schlechtesten schneidet der Versuch Nr. 3 ab. 72,0% der Kontrollen und beinahe ebenso viele geimpfte Tiere, nämlich 63,3%, starben. Der Wirkungsindex ist nur 12,1. Die Mortalitätskurven für dieses Versuchsergebnis zeigen keine wesentlich unterschiedliche Verlaufsform mehr gegeneinander (Abb. 6).

Aus den Versuchen Nr. 4 und 5 ist kaum ein Schutzeffekt abzulesen, so daß der gute Versuch Nr. 6 als positiver "Ausreißer" gewertet werden könnte. Auffallend ist aber, daß in diesem Versuchsansatz die Mortalitätsrate der Kontrolltiere die niedrigste aller vier Testreihen ist. Man könnte sagen, daß infolge der geringen Infektionsbelastung in diesem Versuch sich eine unspezifische Schutzwirkung der oralen Impfung auswirken konnte. Rückschließend könnte vermutet werden, daß bei den drei Versuchen, die ein ungünstiges Ergebnis zeigten, durch eine zu hohe Infektionsbelastung eine durch unspezifische Impfung erlangte Immunität durchbrochen wurde.

Bei Zusammenfassung der 4 Einzelversuche wurde ein Wirkungsindex von 23,8 bei einer Endmortalität von 58,5% bei den immunisierten Mäusen und von 76,7% bei den Kontrolltieren erzielt; in Abb. 7 sind die beiden Mortalitätskurven dargestellt. Die statistische Sicherung ergibt für den Echtheitsgrad der Differenz E einen Wert von 1,3, was zumindest eine geringe Schutzwirkung bedeutet.

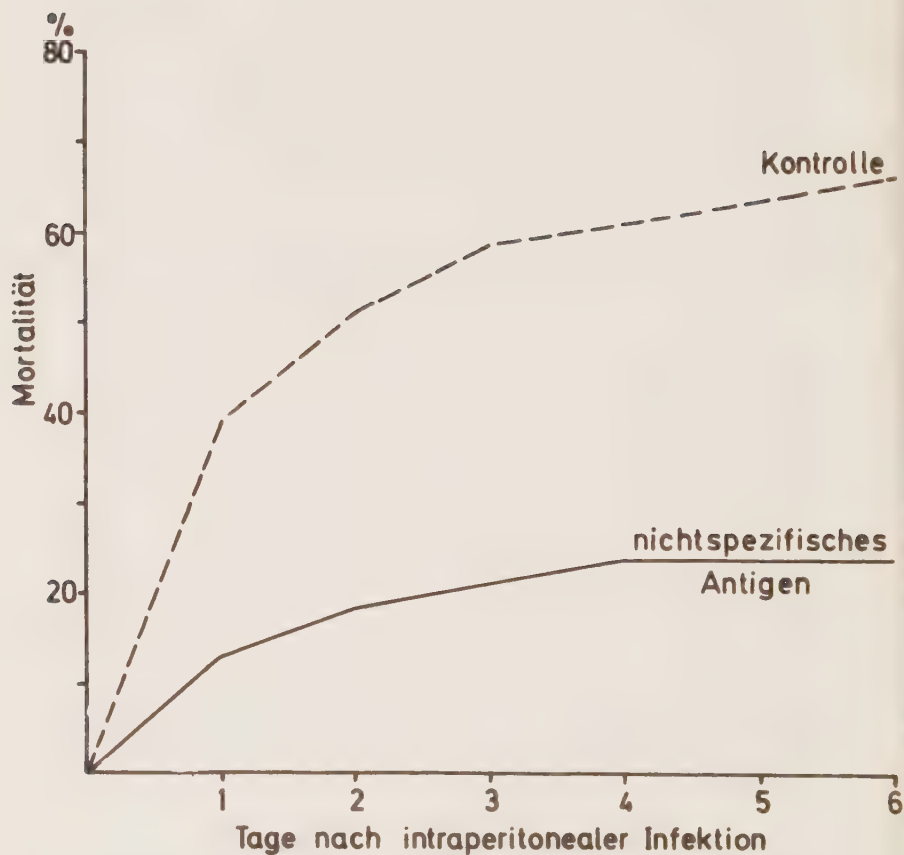


Abb. 5. Anstieg der Mortalität nach i.p. Infektion mit dem DC-Stamm 2380 bei 38 oral mit hitzeinaktivierten DC-Bakterien des Stammes unspezifisch immunisierten Mäusen (ausgezogene Kurve) und 41 nichtgeimpften Kontrollmäusen (gestrichelte Kurve). Einzelversuch Nr. 6.



Abb. 6. Anstieg der Mortalität nach i.p. Infektion mit dem DC-Stamm 2380 bei 49 oral mit hitzeinaktivierten DC-Bakterien des Stammes unspezifisch immunisierten Mäusen (ausgezogene Kurve) und 50 nichtgeimpften Kontrollmäusen (gestrichelte Kurve). Einzelversuch Nr. 3.

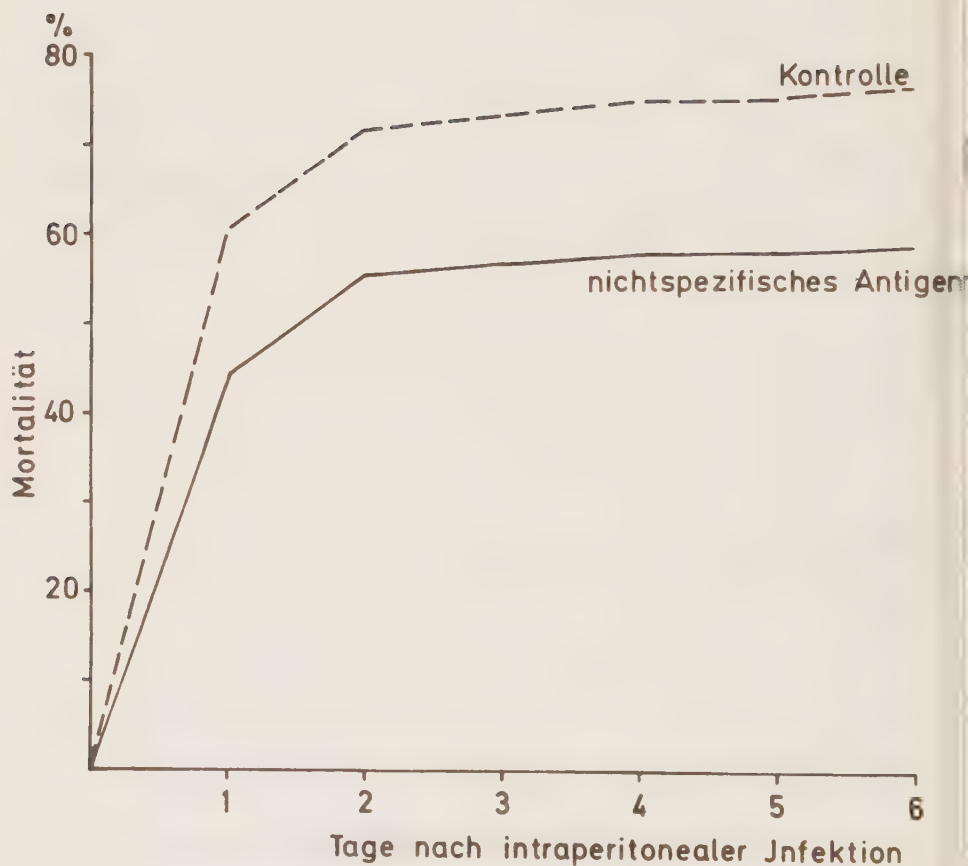


Abb. 7. Anstieg der Mortalität nach i.p. Infektion mit dem DC-Stamm 2380 bei 200 oral mit hitzeinaktivierten DC-Bakterien des Stammes unspezifisch immunisierten Mäusen (ausgezogene Kurve) und 202 nichtgeimpften Kontrollmäusen (gestrichelte Kurve). Zusammenfassung der Versuche Nr. 3-6.

Verglichen mit den Endergebnissen aus den Versuchen zur spezifischen Immunisierung ist ein deutlicher Wirkungsverlust zu verzeichnen, wie man auch bei Vergleich der Summenkurven für spezifische Impfung (Abb. 4) und nicht-spezifische Impfung (Abb. 7) erkennen kann.

1.3 Serologische Untersuchungen

Die serologischen Untersuchungen mit Hilfe des indirekten Hämagglutinationstests wurden unternommen, um zu erfahren, ob sich die unterschiedliche Schutzwirkung der spezifischen und unspezifischen Impfung in verschiedenartigen serologischen Ergebnissen widerspiegelt. Dazu wurden die Seren von insgesamt 61 Mäusen, spezifisch und unspezifisch behandelten und Kontrolltieren, untersucht. Es kamen Seren zur Auswertung, die erstens vor Immunisierungsbeginn, zweitens unmittelbar nach Beendigung der Impfungsperiode, also am 10. Tage, drittens am Tage der intraperitonealen Belastung (17. Tag) und viertens am 6. Tage nach Infektion (23. Tag) gewonnen wurden.

Die Tabelle 3 zeigt die Hämagglutinationstiter einzeln aufgeführt. Die Werte ohne Klammern wurden abgelesen nach drei Stunden Brutschrank (37°C), die Werte in Klammern ergaben sich nach zusätzlichem 24stündigen Belassen der Seren bei Raumtemperatur.

Bei 13 nicht geimpften Tieren wurde zu keinem Zeitpunkt ein Titer festgestellt. Auch unmittelbar nach 10tägiger oraler Gabe des Impfstoffs *E. coli* 2380 bzw. des Behring-Impfstoffs war in 6 bzw. 4 Mäuseseren keine Agglutination zu verzeichnen.

Nach Ablauf von 7 Tagen betrug der Agglutinationstiter in 1 von 2 untersuchten Behring-Mäuseseren 1 : 8, den gleichen Wert hatte 1 von 4 Coli 2380-Seren.

Dann wurden die spezifisch und unspezifisch immunisierten Mäuse und die Kontrolltiere mit dem Stamm *E. coli* 2380 belastet. Bei den 6 Tage später unternommenen serologischen Untersuchungen waren plötzlich wesentliche Titer zu sehen.

Tabelle 3

Die Titer hämagglutinierender Antikörper gegen den DC-Stamm 2380 (O 111 : B 4 : H 12) vor Immunisierungsbeginn, nach letzter oraler Impfung (= 10. Tag nach Versuchsbeginn), nach weiteren 7 Tagen (= 17. Tag nach Versuchsbeginn) und 6 Tage nach intraperitonealer Infektion mit dem gleichen Stamm bei spezifisch immunisierten Mäusen, unspezifisch immunisierten Mäusen mit dem DC-Serotyp O 125 : B 15 : H 19 und nicht immunisierten Kontrolltieren. (Werte ohne Klammern: Ablesung der indirekten H.A.-Reaktion nach 3 Stunden, Werte in Klammern: Ablesung der Reaktion nach weiteren 24 Stunden)

Zeitpunkt der Titermessung	Immunisierungsart		Kontrollen
	spezifisch	unspezifisch	
vor Immu- nisierung = 1. Tag	—	—	0 (0) 0 (0) 0 (1:8) 0 (1:16) 0 (1:16)
nach Immu- nisierung = 10. Tag	0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (1:8) 0 (1:32)	0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (1:32)	0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (1:16)
7 Tage nach letzter Impfung = 17. Tag	0 (0) 0 (0) 0 (1:8) 1:8 (1:8)	0 (0) 1:8 (1:32)	0 (0) 0 (0) 0 (1:4) 0 (1:8)
6 Tage nach i.p. Infek- tion = 23. Tag	1:8 (1:32) 1:32 (1:256) 1:64 (1:64) 1:64 (1:64) 1:64 (1:256) 1:128 (1:256) 1:128 (1:512) 1:512 (1:512) 1:1024 (1:1024) 1:2048 (1:4096) 1:2048 (1:4096) 1:2048 (1:8192)	0 (1:8) 0 (1:8) 0 (1:16) 0 (1:16) 1:4 (1:64) 1:8 (1:16) 1:8 (1:16) 1:32 (1:32) 1:64 (1:128)	0 (0) 0 (1:4) 0 (1:16) 1:8 (1:8) 1:8 (1:16) 1:8 (1:16) 1:16 (1:16) 1:16 (1:32) 1:32 (1:32) 1:32 (1:32) 1:64 (1:128)

Bei 8 von den überlebenden Kontrolltieren schwankten sie zwischen 1 : 8 und 1 : 64, in 3 Seren erfolgte keine Häm-agglutination. Zu ähnlichen Ergebnissen kam man bei den Mäusen, die heterolog immunisiert und infiziert waren: 4mal war der Titer gleich 0, in 5 Fällen variierte er zwischen 1 : 4 und 1 : 64.

Ein enormer Anstieg der Werte, teilweise bis auf 1 : 2048, war bei den homolog immunisierten und infizierten Tieren festzustellen (im Durchschnitt 1 : 203). Hierbei agglutinierten die Seren aller 12 Versuchstiere.

Alle diese Werte stellen die nach 3 Stunden abgelesenen H.A.-Titer dar; diese und die nach 24 Stunden Raumtemperatur erhaltenen Werte sind in Tabelle 4 noch einmal als Mittelwerte zusammengefaßt worden und in Abb. 8 bzw. 9 graphisch dargestellt.

Tabelle 4

Die Durchschnittstitel hämagglutinierender Antikörper gegen den DC-Stamm 2380 (O 111:B 4:H 12) vor und nach Immunisierung, sowie nach intraperitonealer Infektion mit dem gleichen Stamm bei spezifisch immunisierten Mäusen, nichtspezifisch immunisierten Mäusen (O 125:B 15:H 19) und nicht immunisierten Kontrolltieren.

Immuni- sierungsart	vor Immu- nisierung 1.Tag	nach Immu- nisierung 10.Tag	vor Infek- tion 17.Tag	nach Infek- tion 23.Tag
spezifisch	-	0 (1:3)	1:2 (1:3)	1:203 (1:456)
unspezifisch	-	0 (1:2)	1:3 (1:6)	1:4 (1:22)
Kontrollen	0 (1:5)	0 (1:2)	0 (1:2)	1:8 (1:15)

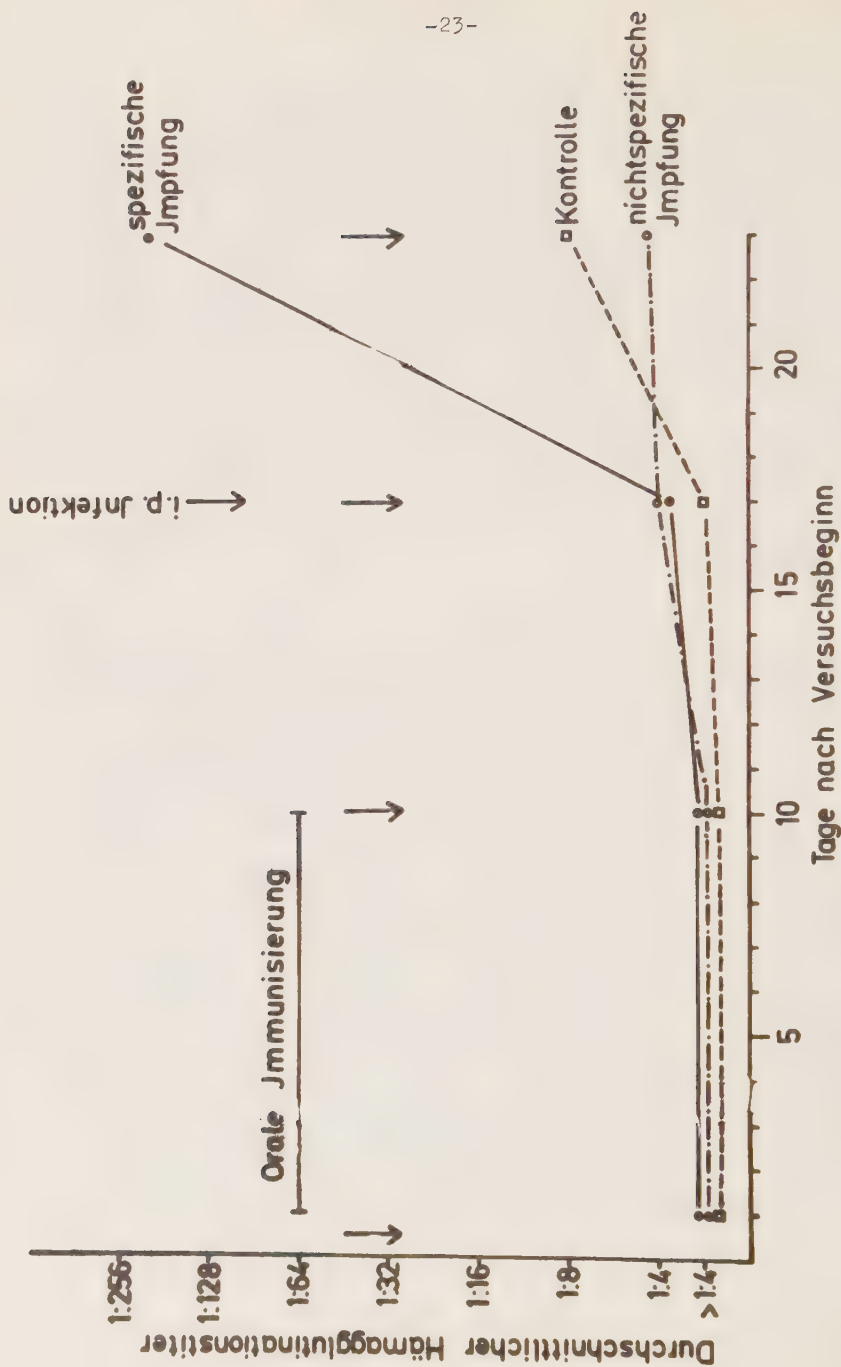


Abb.8. Anstieg der Titer hämagglutinierender Antikörper gegen den DC-Stamm 2380 nach i.p. Infektion mit demselben Stamm bei oral geimpften Mäusen (spezifisch = ausgezogene, unspezifisch = Punkt-Strich-Kurve) und nichtgeimpften Kontrollmäusen (gestrichelte Kurve). Zwischen-Werte.

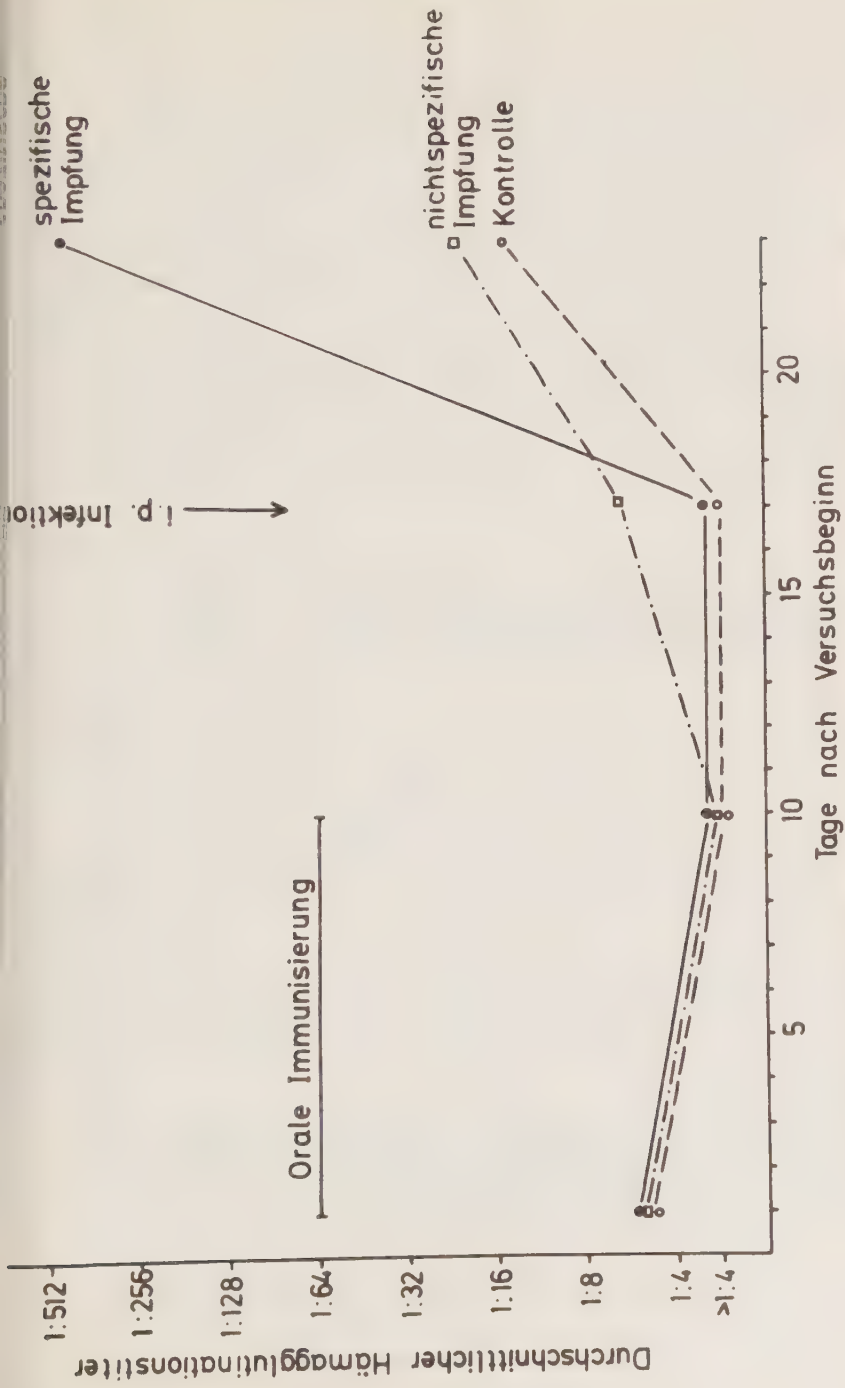


Abb. 9. Anstieg der Titer hämagglutinierender Antikörper gegen den DC-Stamm 2380 nach i.p. Infektion mit demselben Stamm bei oral geimpften Mäusen (spezifisch = ausgezogene, unspezifisch = Punkt-Strich-Kurve) und nichtgeimpften Kontrollmäusen (gestrichelte Kurve). 24-Stunden-Werte.

Wie wir schon in der 5. Mitteilung dargelegt haben, war überraschend

1. das Fehlen von Normalantikörpern vor der Impfung,
2. das Ausbleiben von Antikörpern nach oraler Immunisierung,
3. das Erscheinen von Titerwerten nach intraperitonealer Belastung, wobei besonders die hohen Antikörperspiegel bei den spezifisch behandelten Tieren auffallend waren.

Wir zogen daraus die Schlußfolgerung, "daß die orale Immunisierung das antikörperbildende System der Mäuse spezifisch so vorbereitet hat, daß nach einer Belastung große Mengen von Antikörpern in das strömende Blut abgegeben werden können" (12).

2. Serologische Untersuchung auf Antikörper gegen Dyspepsiecoli-Bakterien beim Menschen

Da bei weißen Mäusen vor der Immunisierung keine Antikörper nachgewiesen wurden, interessierte die Frage, ob wir auch beim Menschen in den anzuschließenden Immunisierungsversuchen von einem Nulltiter ausgehen würden. Bei Fehlen von humoralen Antikörpern hätten wir uns dann nicht gewundert, wenn - entsprechend den Tierversuchen - auch beim Menschen nach der oralen Impfung keine Antikörper aufgetreten wären.

Um diese Frage zu klären, wurde das Blut von 55 männlichen Blutspendern und 50 Schwangeren untersucht und getrennt ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in Normalverteilungsdiagrammen dargestellt (32); sie werden in den Abbildungen 10 bis 12 gezeigt.

In allen untersuchten Humanseren wurden Antikörper gegen den Dyspepsiecoli-Stamm K 70 CANIONI mit der Antigenformel O 125 : B 15 : H 19 gefunden.

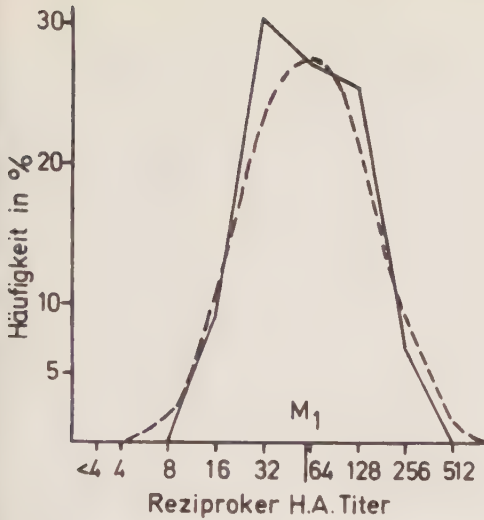


Abb.10. Häufigkeitsverteilung der Titer hämagglutinierender Antikörper gegen den DC-Stamm O 125:B 15:H 19 bei 55 männlichen Blutspenderseren. Beobachtete Verteilung = ausgezogene Kurve, errechnete Normalverteilung = gestrichelte Kurve, M_1 = Mittelwert der Hämagglutinationstiter.

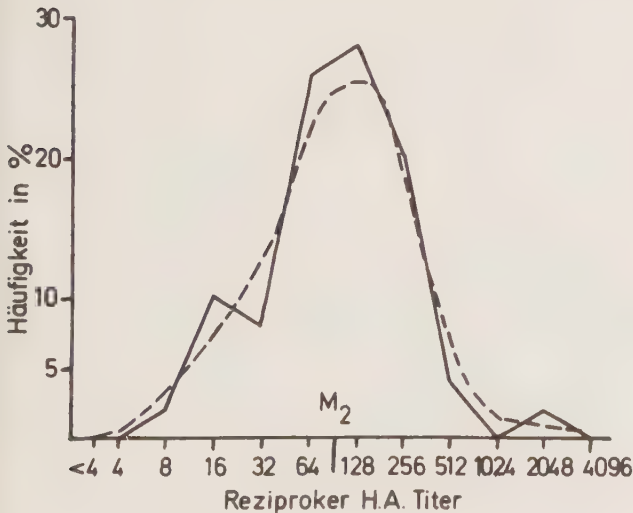
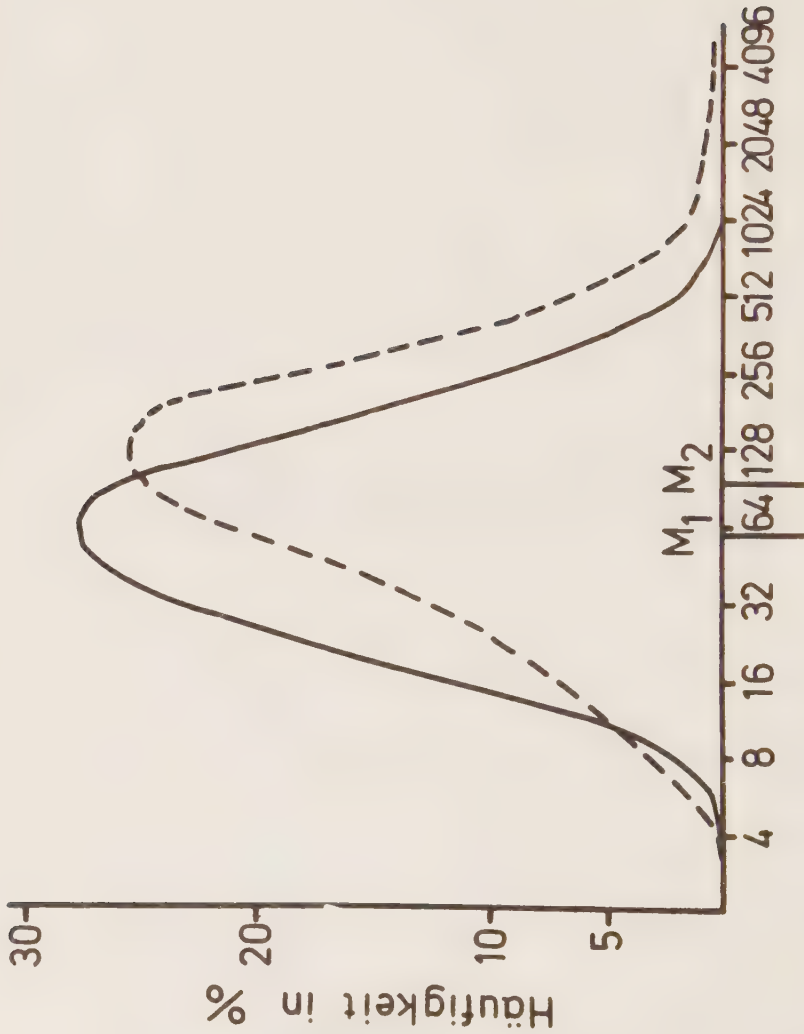


Abb.11. Häufigkeitsverteilung bei 50 Schwangerenseren. Versuchsbedingungen und Verteilungskurven wie bei Abb.10. M_2 = Mittelwert der H.A.-Titer.



Reziproker H.A. Titer

Abb. 12. Häufigkeitsverteilungen der Titer hämagglutinierender Antikörper gegen den DC-Stamm 0 125 in 55 männlichen (ausgezogene Kurve) und 50 Schwangeren (gestrichelte Kurve). M1 = Mittelwert der männlichen, M2 = Mittelwert der Schwangeren.

Es ergab sich ein durchschnittlicher Titer M_1 bei den männlichen Blutspendern von 1 : 60 (24h-Wert 1 : 123), bei den Schwangeren M_2 von 1 : 94 (24h-Wert 1 : 147). Um die Frage zu klären, ob ein echter Unterschied der Mittelwerte M_1 und M_2 statistisch feststellbar ist, oder ob die Werte nur im Rahmen von Zufallsschwankungen voneinander abweichen, wurde der mittlere Fehler der Differenz der beiden Mittelwerte berechnet. Da die beobachtete Differenz aus M_1 und M_2 mit 0,651 nicht größer als das Dreifache des mittleren Fehlers der Differenz (= 0,26) war, ist die Echtheit des Unterschiedes statistisch nicht sichergestellt (nach RAETTIG (32)).

In Abb. 12 fällt die breite Basis der Verteilung bei den Schwangerenseren auf, es wurden relativ viele Seren mit sehr niedrigem bzw. sehr hohem Antikörperspiegel beobachtet. Sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen war die durchschnittliche Titerhöhe unabhängig vom Alter fast konstant. Es ist dabei zu berücksichtigen, daß die Versuchspersonen in Bezug auf ihr Lebensalter (20 bis 45 Jahre) nur eine sehr begrenzte Auswahl darstellten.

3. Selbstversuch und Freiwillige

Zur Beurteilung einer Impfreaktion beim Menschen wurde der Antikörpertiter vor und nach der oralen Immunisierung bestimmt. Alle folgenden Werte sind Mittelwerte aus drei Ansätzen mit dem jeweiligen Serum.

Um die Verträglichkeit des Behring-Impfstoffs zu testen, wurde zuerst ein Selbstversuch unternommen. Vor Beginn der Immunisierungsperiode betrug der Titer 1 : 16, nach 10maliger Einnahme der Kapseln war er auf 1 : 43 angestiegen. 10 Tage später wurde ein H.A.-Titer von 1 : 187 und nach weiteren 10 Tagen ein solcher von 1 : 203 gemessen. Der Impfstoff wurde gut vertragen, es traten keine enteritischen oder sonstige Symptome auf.

Zwei freiwillige Personen unternahmen ähnliche Versuche, es wurde aber nur je $\frac{1}{4}$ derjenigen Dosis eingenommen, mit der im Selbstversuch geimpft wurde. In dem einen Fall stieg der Titer von 1 : 45 vor Immunisierung auf 1 : 90 am 5. Tage an, fiel am 14. Tage wieder auf den Ausgangswert, um am 25. Tage auf 1 : 128 anzusteigen.

Im anderen Fall blieb der Antikörpertiter mit 1 : 128 vor und 5 Tage nach Beginn der oralen Immunisierung konstant, danach fiel er auf 1 : 64 ab.

Aus den Titerbewegungen kann abgelesen werden, daß der Organismus auf die Antigenzufuhr reagierte; bei 2 von 3 Erwachsenen mit einem Anstieg des H.A.-Titers, in einem Fall mit dem Absinken desselben. Diese Reaktion des Organismus ist besonders hervorzuheben, da eine entsprechende Antwort bei den Immunisierungsversuchen an Mäusen gänzlich fehlte, diese aber, wie die Infektionsbelastungsversuche gezeigt hatten, dennoch hochgradig geschützt waren.

4. Versuche an Kindern

Da bei den Erwachsenen nach Einnahme des Impfstoffs keine Beschwerden bemerkt worden waren, wurde die Behring-Vakzine 9 Kindern, von denen keins an einer Dyspepsie litt, verabreicht. Während und nach der Impfung kam es zu keinen dyspeptischen oder anderen neuen Erkrankungen.

Wie die Tabelle 5 zeigt, war im Anschluß an die orale Impfung (1 - 4 Tage nach der letzten Immunisierung) bei 8 Kindern ein Ansteigen des Antikörpertiters zu verzeichnen, bei 4 von diesen zwei oder mehr Verdünnungsstufen erreichend. Nur in einem Fall bleiben die Werte gleich.

Diese Immunisierungswirkung scheint jedoch nicht allzu lange anzuhalten, denn schon 1 - 2 Wochen später waren die Titer von 6 Seren wieder auf den Ausgangswert abgefallen, bei einem Kind sogar darunter.

Tabelle 5

Die Titer hämagglutinierender Antikörper gegen den Dyspeptecoli-Stamm O 125 : B 15 : H 19 vor und nach oraler Immunisierung mit demselben Stamm bei 9 Kindern beiderlei Geschlechts im Alter von 0,5 - 7,1 Jahren. (Werte ohne Klammern: Ablesung der indirekten H.A.-Reaktion nach 3 Stunden, Werte in Klammern: Ablesung der Reaktion nach weiteren 24 Stunden. Die Tabelle zeigt reziproke Werte)

Alter in Jahren	Geschlecht	vor Impfung	1-4 Tage nach Impfung	7-16 Tage nach Impfung	18-31 Tage nach Impfung
0,5	weiblich	4(8)	8(32)	4(8)	
0,5	männlich	8(16)	32(32)	8(16)	
1,0	weiblich	8(13)	45(90)	23(32)	
1,2	männlich	16(16)	64(256)	32(32)	32(32)
1,4	männlich	64(128)	256(512)	45(45)	32(32)
2,1	weiblich	64(128)	181(256)	64(64)	64(90)
5,3	männlich	64(90)	64(90)	64(90)	
6,4	weiblich	256(256)	512(512)	256(256)	
7,1	männlich	64(64)	181(181)	128(128)	128(128)

Bei Betrachtung der Werte vor Impfbeginn fällt auf, daß die Antikörpertiter bei den 3 Kindern bis zu 1 Jahr besonders niedrig sind. Mit zunehmendem Lebensalter kam es etwa gleichermaßen auch zum Anstieg des Antikörperspiegels. Die jeweiligen serologischen Reaktionen nach Immunisierung zeigten insofern eine Abhängigkeit vom Lebensalter als bei den jüngeren Kindern ein relativ stärkeres Anheben der Antikörpertiter auftrat. Bis zum Lebensalter von 2,1 Jahren nahmen die Hämagglutinationstiter im Durchschnitt um zwei Verdünnungsstufen zu, bei den älteren Kindern um weniger als eine. Das spricht offensichtlich für ein stärkeres Immunitäts geschehen im Organismus des Säuglings.

Die Ablesung nach 24 Stunden zeigt in etwa die gleichen Verhältnisse auf einem etwas höheren Titerniveau. Auch hier

war unmittelbar nach der letzten oralen Einnahme des Impfstoffs der Titer in 8 von 9 Fällen angestiegen, in 4 Serien sogar um das 4fache des Ausgangswertes; diese starken Reaktionen waren nur bei Kindern bis zu einem Alter von 1,4 Jahren zu finden. 7 bis 16 Tage danach waren die Werte wieder abgesunken, unabhängig vom Alter des Kindes.

Zur Bestimmung des Antikörpertiters 28 bis 31 Tage nach letzter oraler Impfung standen nur noch 4 der 9 Kinder zur Verfügung, die anderen waren in der Zwischenzeit aus dem Krankenhaus entlassen worden. 3 von ihnen zeigten den gleichen Hämagglutinationstiter wie 2 Wochen zuvor (= 7 bis 16 Tage nach Impfung), bei einem Kind war der Titer noch um $1/2$ Verdünnungsstufe abgefallen.

Die Abbildungen 13 - 16 zeigen die Ergebnisse aus Tabelle 5 graphisch dargestellt, und zwar den starken Anstieg der Titer in den ersten 4 Tagen nach letztmaliger oraler Impfung in den Abbildungen 13 und 14 und den Abfall nach 7 bis 16 Tagen in den Abbildungen 15 und 16. In diesen Diagrammen ist die Gerade $y = x$ gezeichnet; sie ist der geometrische Ort aller der Punkte, die sich bei gleichem Wert von prae vacc. und post vacc. ergeben, d.h. im Organismus ist eine serologische Reaktion ausgeblieben. Liegen dagegen die Punkte außerhalb der Geraden, so ist eine Veränderung des Hämagglutinationstiters nach Immunisierung eingetreten; ihre Lage oberhalb der Geraden ergibt sich bei einem Anstieg des H.A.-Titers nach Impfung. Bei den 9 Kindern betrug der durchschnittliche Antikörpertiter vor Einnahme des Impfstoffs 1 : 30 (24h-Wert 1 : 44) und unmittelbar nach Immunisierung 1 : 84 (24h-Wert 1 : 144). Wie man sieht ist der Titer um weit mehr als das Doppelte angestiegen. Ein bis zwei Wochen nach letzter Antigengabe war der Durchschnittswert 1 : 37 (24h-Wert 1 : 47); er war damit etwa auf den Ausgangswert abgefallen.

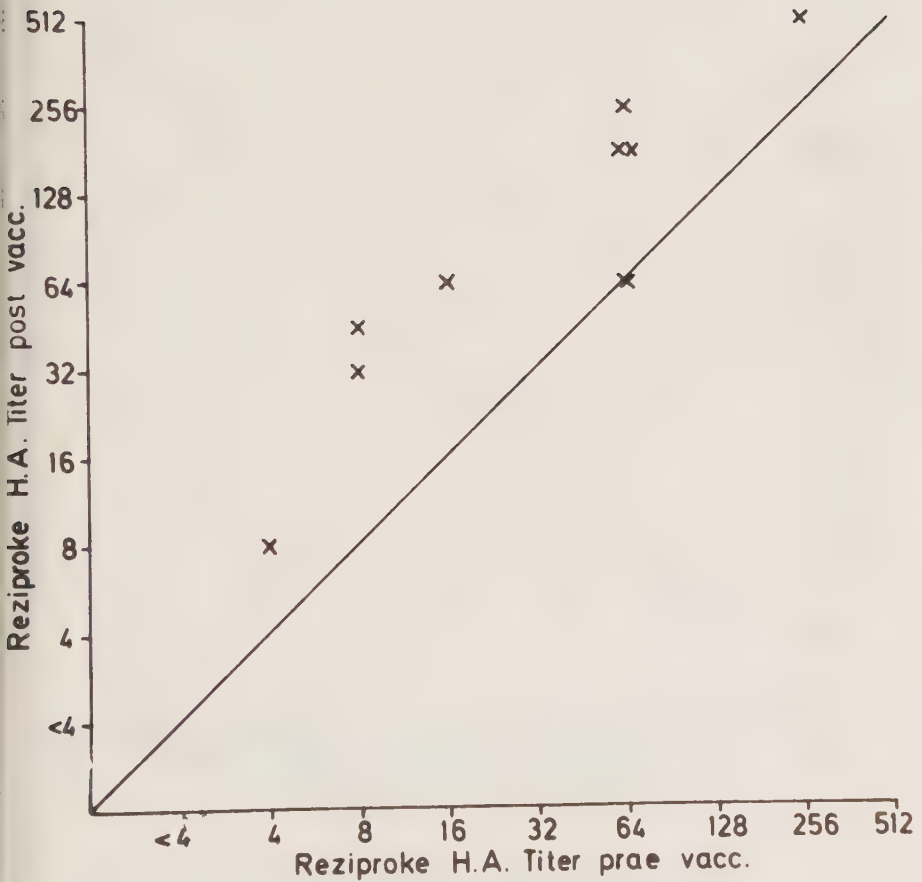


Abb.13. Anstieg der Titer hämagglutinierender Antikörper gegen den DC-Stamm O 125 : B 15 : H 19 in den ersten 4 Tagen nach oraler Immunisierung mit demselben Stamm bei 9 Kindern im Alter von 0,5 bis 7,1 Jahren. Ablesung der indirekten Hämagglutinationsreaktion nach 3 Stunden.

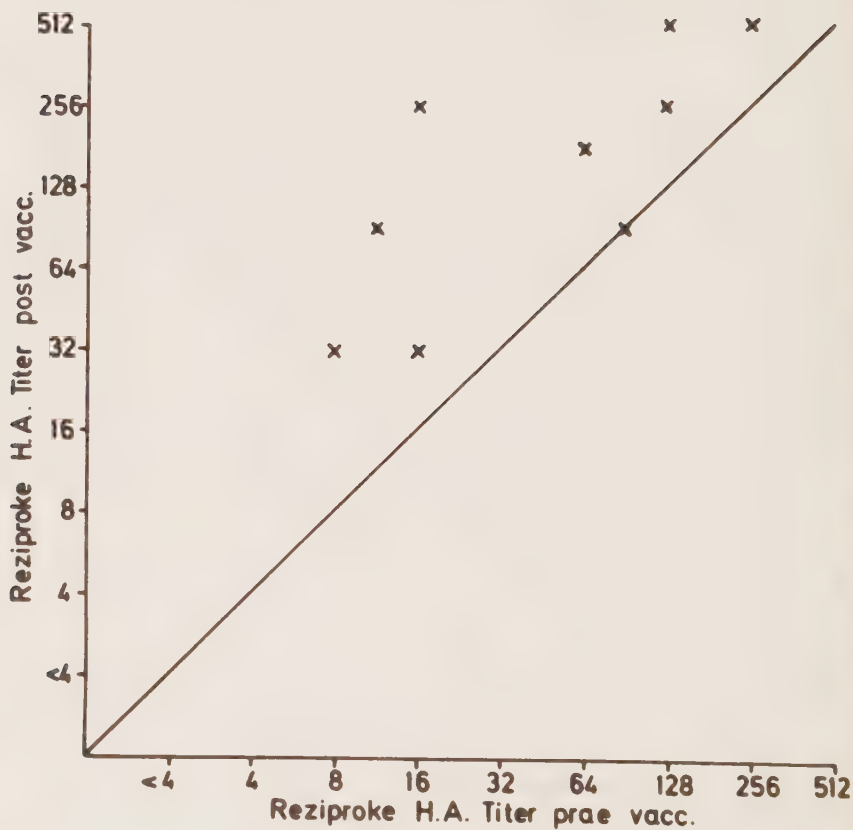


Abb.14. Anstieg der Titer hämagglutinierender Antikörper gegen den DC-Stamm O 125 : B 15 : H 19 in den ersten 4 Tagen nach oraler Immunisierung mit demselben Stamm bei 9 Kindern im Alter von 0,5 bis 7,1 Jahren. 24-Stunden-Werte

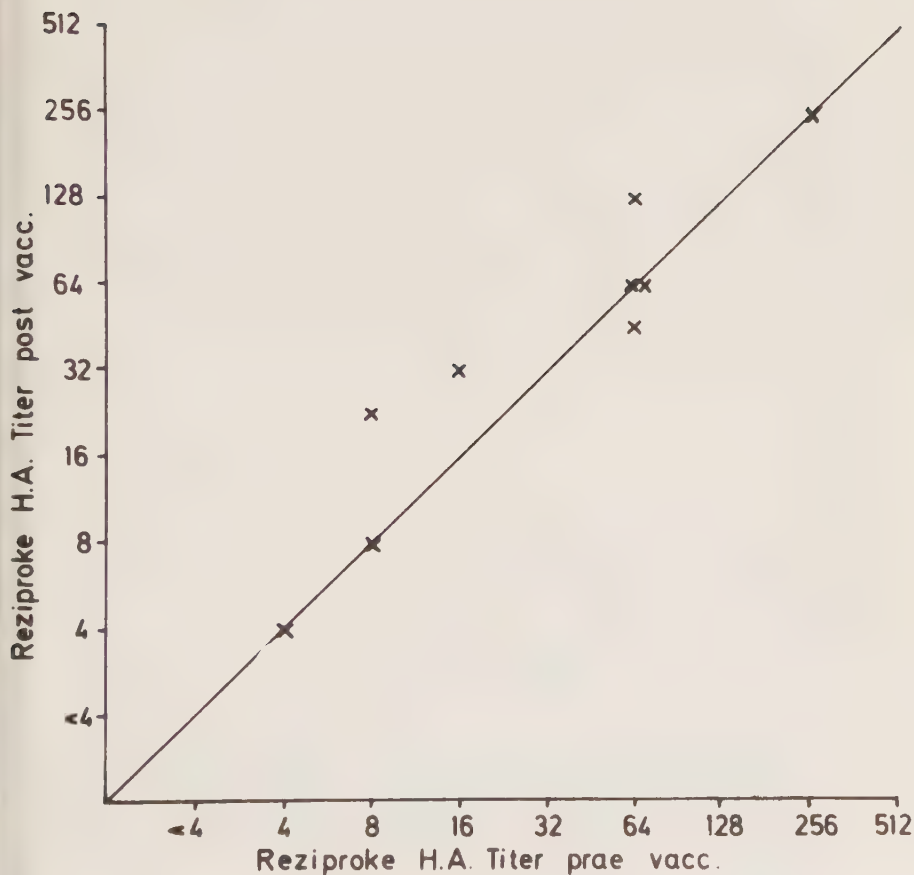


Abb.15. Abfall der Titer hämagglutinierender Antikörper gegen den DC-Stamm O 125 : B 15 : H 19 zwischen dem 7. und 16. Tag nach letztmaliger oraler Immunisierung mit demselben Stamm bei 9 Kindern im Alter von 0,5 bis 7,1 Jahren. Ablesung der H.A.-Reaktion nach 3 Stunden.

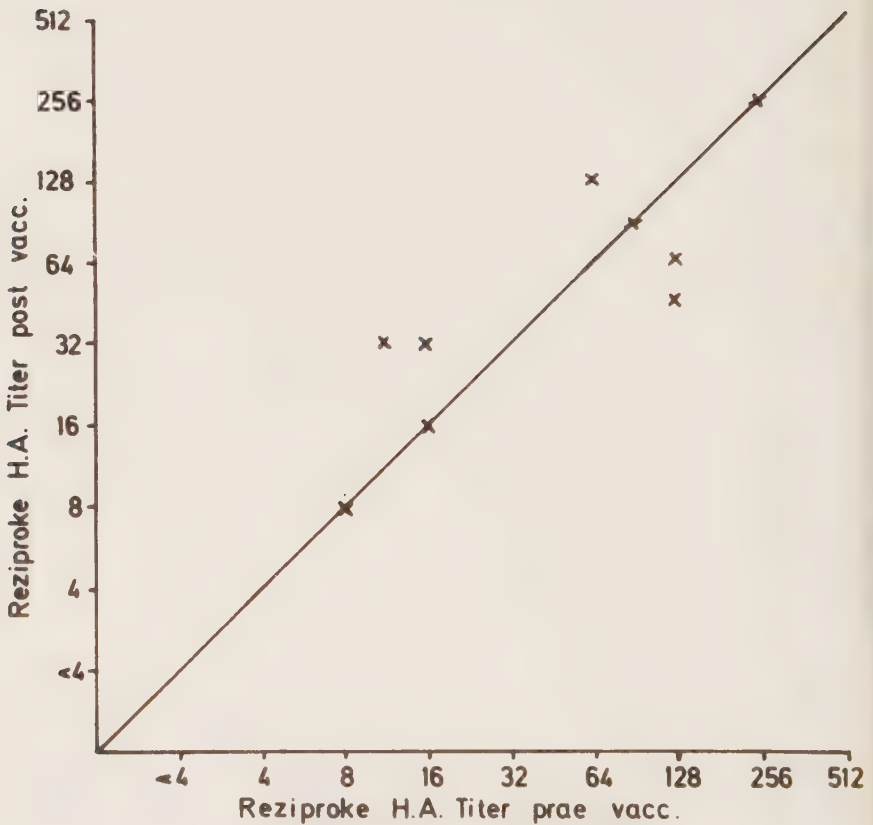


Abb.16. Abfall der Titer hämagglutinierender Antikörper gegen den DC-Stamm O 125 : B 15 : H 19% zwischen dem 7. und 16. Tag nach letztmaliger oraler Immunisierung mit demselben Stamm bei 9 Kindern im Alter von 0,5 bis 7,1 Jahren. 24-Stunden-Werte.

Es hat also in den Versuchen an Kindern eine serologisch meßbare Reaktion nach Verabreichung des Impfstoffs stattgefunden, die auch in den Untersuchungen an Erwachsenen beobachtet worden war. Diese humorale Antwort des menschlichen Organismus auf das eingebrachte Antigen steht in deutlichem Gegensatz zur fehlenden Reaktion bei den Mäusen.

Ob nun tatsächlich ein positives Ergebnis durch die orale Impfung im Sinne eines Anhebens der Immunitätslage eingetreten ist, kann natürlich nicht mit dem beobachteten Anstieg des Antikörpertiters bewiesen werden. Hier könnte den eindeutigen Beweis nur eine Infektionsbelastung erbringen, wie sie jedoch an Tieren nur durchgeführt werden kann.

5. Kasuistik

Es kam ein 65jähriger Patient mit einer Anurie zur Aufnahme, die Diagnose ergab Urämie bei unklarer Ureterstenose und eine rechtsseitige Pyonephrose bei Solitärniere. Er wurde sofort chirurgisch versorgt, man legte die Niere frei und entfernte reichlich Pus aus dem Nierenbecken. Die Niere wurde gefistelt und nach außen abgeleitet. Im Hiter wurden Colibakterien nachgewiesen.

Während der folgenden zwei Monate schien die Prognose sehr ungünstig. Es kam zur Rest-N-Erhöhung bis auf 173 mg%, zu urämischen Symptomen, septischen Temperaturen und Gewichtsverlust. Der Patient wurde mit den Antibioticis Nogram und Tromocaps, mit antiurämischen Infusionen sowie Bluttransfusionen wegen sekundärer Anämie behandelt. Unter dieser Therapie erholte sich der Patient einigermaßen, der Rest-N normalisierte sich, im Urin wurden aber weiterhin massenhaft Bakterien gefunden, und es traten immer wieder septische Temperaturen auf.

Eine Besserung des Gesundheitszustandes trat nach oraler Einnahme einer Autovakzine ein. Die Temperatur stieg

danach an keinem Tage mehr über 37° C an, im Urin waren nur noch ganz vereinzelt Bakterien nachzuweisen, und das Körpergewicht nahm in 8 Tagen um 3,7 kg zu. Es muß bemerkt werden, daß der Patient gleichzeitig weiterhin mit Antibioticis behandelt wurde. Er konnte nach 20tägiger Behandlung mit dem Impfstoff in relativ gutem Allgemeinzustand aus dem Krankenhaus entlassen werden.

Die serologischen Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse: der Agglutinationstiter in der Widalschen Reaktion gegen den aus dem Blut isolierten Colistamm betrug 3 Tage nach Entlassung 1 : 8192. In den folgenden 3 Wochen wurde dem Patienten die Autovakzine nicht eingegeben, der Titer stieg auf 1 : 32768 an. Während der weiteren diesmal 6wöchigen Therapie mit der Vakzine fiel der Titer von diesem Wert über 1 : 1289 nach nur 7tägiger Behandlung auf 1 : 512 am Ende der Impfung.

Der Patient hatte während der Beobachtungszeit 20 kg an Gewicht zugenommen, er erschien wiederhergestellt.

D. Diskussion

Die Tierversuche, bei denen mit dem DC-Stamm 2380 immunisiert und homolog intraperitoneal infiziert wurde, zeigten eine sehr gute Schutzwirkung durch die orale Impfung. Die Mortalität, die hier als Maßstab für eine erlangte Immunität genommen wurde, war bei den geschützten Mäusen um mehr als $\frac{2}{3}$ niedriger als bei den Kontrolltieren. Der Wirkungsindex von 73,6 hält den allgemeinen Anforderungen an eine vorbeugende Impfung stand. Dieser gute Impferfolg stimmt mit den Ergebnissen aus entsprechenden Versuchen von PIRINGER (29) und LODENKÄMPER (13) überein. Auch STELLMACHER und MÜLLER erzielten mit der oralen Impfung gegen die Colienterotoxämie bei Schweinen einen ausgezeichneten Immunisierungseffekt (42). Die zuletzt erwähnten

Autoren beschreiben neben der prophylaktischen auch eine gute therapeutische Wirkung.

MOCHMANF, OCHLITZ und Mitarbeiter benutzten bei ihren Versuchen den gleichen DC-Stamm wie wir, nämlich den besonders mäusepathogenen Stamm 2380 (18). Die Ausführung ihrer Versuche stimmt mit unserer weitgehend überein, auch sie immunisierten durch einmalige orale Gabe des Impfstoffs und infizierten am 7. Tage nach der letzten Verabreichung intraperitoneal mit demselben Stamm. Als Antigen benutzten sie einen Natriumdesoxycholat-Extrakt und in einer zweiten Versuchsreihe hitzeabgetötetes Antigen (25). Bei 358 Mäusen, die mit dem Desoxycholatantigen behandelt worden waren, betrug die Mortalität nach Infektion 23,1% und die bei den Kontrollen 83,5%, was einen Wirkungsindex von 73,6 entspricht. Er war damit genau so groß wie in unseren Versuchen. Ein noch höherer Wirkungsindex von 83,5 wurde bei Impfung mit dem hitzeinaktivierten Antigen erzielt. In weiteren Untersuchungen arbeiteten sie mit dem DC-Stamm 172 und auch hier ließ sich eine gute belastbare Immunität im aktiven Mäuseschutzversuch zeigen.

An einer anderen Gattung aus der Familie der Enterobacteriaceen, den Salmonellen, konnte RAETTIG ebenfalls eine sehr gute Immunität nach der oralen Impfung feststellen (35). Dieses Ergebnis stützt sich im Vergleich zu unseren Coli-versuchen auf eine etwa 9mal so große Anzahl von Versuchstieren, der Wirkungsindex betrug 52,2, der Impferfolg wurde mit dem Echtheitsgrad der Differenz $E = 5,5$ statistisch gesichert.

Die Versuche unterscheiden sich nicht nur durch die Bakteriengattung, sondern auch durch den Ort der Infektion. RAETTIG infizierte oral, die Keime wurden somit auf natürlichem Wege in den Körper gebracht, während in den Coli-versuchen der unnatürliche Weg einer intraperitonealen Infektion beschritten wurde. Wie schon unter "Material und Methoden" angedeutet wurde, war es nicht möglich, in Bezug auf den Applikationsort die gleichen Versuchsbedingungen

zu schaffen. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß der Stamm E. coli 2380 oral gegeben keine sichtbaren Krankheiterscheinungen hervorrief, dagegen eine intraperitoneale Infektion zum Tode der Tiere führen kann. Dieser Unterschied bildet den Ausgangspunkt für eine später noch zu diskutierende Überlegung.

Die hohe Virulenz der i.p. eingebrachten Keime zeigte sich in dem nach Infektion schnell eingetretenen Tod der Versuchstiere: setzen wir die Anzahl der gestorbenen Tiere in den beiden Gruppen jeweils gleich 100%, so starben von den Immuntieren über 80% und von den Kontrollen 75% am 1. Tage post infectionem, nach dem 6. Tage erfolgte in keiner der Gruppen ein weiteres Absterben. Das bedeutet, daß sich der Organismus der Immuntiere in den sechs Tagen zwischen letzter oraler Immunisierung und Infektion auf eine eventuell folgende Infektion ausreichend eingestellt hat und ihr wirkungsvoll entgegentreten kann; oder er hat diese Fähigkeit noch nicht bzw. nicht mehr und unterliegt. Entsprechend ist es bei den Kontrollen.

Im folgenden soll die Frage behandelt werden, wodurch und an welchem Ort sich der Organismus der Immuntiere auf eine Infektion eingestellt haben könnte. Dazu wollen wir den Weg der i.p. eingebrachten lebenden Dyspepsiecoli-Bakterien verfolgen. Wie PIRINGER beschreibt, kommt es zunächst zu einer starken Keimvermehrung; die danach folgende Peritonitis führt zu einer Intoxikation (29). Nimmt man nun an, daß durch die orale Immunisierung ein isolierter Schutz in der Darmschleimhaut aufgebaut wurde, wie er von BESREDKA postuliert wurde, so wird das Blut mit dem DC-Endotoxin hier zum ersten Mal auf ein vorbereitetes und in Abwehrbereitschaft stehendes Gewebe treffen. An welche Substanzen und Mechanismen dieser Schutzeffekt im einzelnen gebunden ist, ist noch unbekannt. Es wird allgemein angenommen, daß Coproantikörper sowie Lymphozyten und andere zelluläre Elemente eine Rolle dabei spielen. In der Folge müßte es

zur Reaktion zwischen den mit dem Blut angeschleppten Bakterien und dem Darmepithel bzw. dessen Schutzstoffen kommen. Daraus könnten zwei Dinge resultieren:

Erstens, die Bakterien werden an der Darmschleimhaut abgefangen und verlieren damit ihre Bedeutung für den Gesamtorganismus und zweitens könnte es gleichzeitig durch den Reiz, den das Antigen auf gewisse vorbereitete Zellen in der Schleimhaut ausübt, zur Bildung von spezifischen Antikörpern kommen, die ihrerseits nun mit dem Blut abtransportiert werden und den Körper überschwemmen. Gewisse Zellen können durch den Kontakt mit dem Antigen die Eigenschaft erwerben, die Antikörper zu synthetisieren; im Notfall kann eine schnelle Aktivierung dieser Eigenschaft erfolgen (33).

Da die Umlaufzeit des Blutes ziemlich kurz ist, würde ein gewiß nicht unbeträchtlicher Anteil des Blutes von dem Antigen befreit und gleichzeitig mit spezifischen Antikörpern beladen werden. Diese könnten nun ihrerseits durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion in den verschiedensten Organen zu einer weiteren Entgiftung des Organismus beitragen.

Nach dieser Spekulation erfolgt der erste Kontakt zwischen den i.p. eingebrachten Bakterien und den Abwehrmechanismen erst in der Darmschleimhaut. Es ist sehr fraglich, ob ein so gearteter isolierter lokaler Schutzeffekt einen Organismus in relativ kurzer Zeit entgiften könnte und ob er überhaupt ausreichend wäre. Denn da die Versuchstiere zum größten Teil schon am ersten Tage nach Infektion starben, müßte es bei den meisten der Überlebenden Tiere in weniger als 24 Stunden so weit zu einem Abfangen der Bakterien gekommen sein, daß der Tod nicht mehr eintrat. Berücksichtigt man diesen Einwand, dann scheint es wahrscheinlicher zu sein, nicht die alleinige Immunität des Darmes als Ursache für einen ausreichenden Schutz anzunehmen, sondern es müßten dann weitere Gewebe im Körper eine Abwehrfähigkeit erworben haben, z.B. auch das Lymph-

gefäßsystem. Nehmen wir in den Mesenteriallymphknoten des Bauchraumes einen vorgeschalteten Schutz an, so käme es bereits hier zum ersten Reagieren zwischen Bakterien und abwehrbereitem Gewebe in Form einer Entgiftung. Eine eventuell tödlich verlaufende Peritonitis würde durch die aufgebotenen Schutzmechanismen frühzeitig abgefangen werden können. Im weiteren Verlauf könnte es zum gleichen Reaktionsmodus kommen, wie er oben beschrieben wurde.

OCKLITZ, MOCHMANN und Mitarbeiter versuchten durch folgende Versuchsanordnung eine lokale Immunität der Darm-schleimhaut nachzuweisen: sie immunisierten 10mal oral mit dem inaktivierten DC-Stamm 2380 und belasteten zwischen dem 4. und 24. Tage nach letzter Impfstoffgabe oral mit dem gleichen Stamm (26). 14 bis 19 Stunden danach untersuchten sie den Kot der geimpften Mäuse und der Kontroll-tiere auf DC-Keime in der Hoffnung, daß die immunisierten Tiere weniger Bakterien ausscheiden würden, bedingt durch eine Schädigung der Keime durch die lokale Immunität. Mit dieser Anordnung des Versuches ließ sich ein Schutzmecha-nismus in der Darmwand nicht nachweisen, sondern erst wenn die Tiere mit Streptomycin vorbehandelt wurden und anschließend oral immunisiert und infiziert wurden. Es wurde dann eine Verringerung der ausgeschiedenen Keim-menge und eine Verkürzung der Ausscheidungszeit bei den Immuntieren beobachtet, die von den Autoren als spezi-fischer Schutzeffekt der Immunisierung angesehen wurden.

Schon in den 30er Jahren hatten sich TORIKATA und SHAKUDO bemüht, das Immunitätsgeschehen bei einer oralen Impfung zu klären (45). Sie immunisierten Meerschweinchen oral mit hitzeinaktivierten Colibakterien über 6 Tage. Nach 10 Tagen stellten sie Preßsäfte von Darm, Leber, Nieren und Milz der geimpften Tiere her, die sie dann anderen Meerschweinchen intraperitoneal zur Immunisierung verab-folgteten; weitere Tiere bekamen das Serum der oral immu-nisierten Tiere. Bei i.p. Infektion dieser Meerschweinchen

mit virulenten Colibakterien zeigte es sich, daß alle die Tiere überlebten, die die Säfte von Darm und Niere erhalten hatten, während diejenigen, die Preßsäfte von Leber und Milz oder das Serum bekommen hatten, zum großen Teil starben.

In einem Parallelversuch immunisierten sie Meerschweinchen mit inaktivierten Colibakterien durch subcutane Impfung. Dann stellten sie wiederum Preßsäfte her und immunisierten andere Versuchstiere durch intraperitoneale Gabe von Säften bzw. Serum. Hierbei nun starben alle die Tiere, die mit Organpreßsäften behandelt worden waren; nur mit dem Serum behandelte Meerschweinchen widerstanden der i.p. Infektion. Daraus wurde geschlossen, daß die Schutzwirkung bei parenteraler Immunisierung vor allem im Blutserum gelegen ist, während nach oraler Immunisierung die Immunität vor allem im Darmtrakt zu finden ist. Es seien hier sessil gebildete Immunkörper entstanden.

In weiteren Versuchen von TORIKATA und IMAIZUMI wurden die Preßsäfte und das Serum der oral immunisierten Meerschweinchen auf eine fördernde Wirkung bei der Phagozytose von Colibakterien geprüft (44). Es ließ sich eine große Phagozytoserate und damit eine große Menge von Immunkörpern bei den Säften aus dem Darm zeigen. Das Serum dagegen enthielt kaum Antikörper.

Um nun exakt zu ermitteln, welche Gewebe im Körper nach oraler Immunisierung in einer Abwehrspannung stehen, soll hier der Vorschlag von RAETTIG aufgegriffen werden, der eine histologische Aufarbeitung der Schleimhautepithelien und eine Darstellung zellulärer Reaktionen für wünschenswert hält (37).

Die vorher erwähnte Spekulation für einen möglichen Reaktionsablauf soll jetzt mit den serologischen Ergebnissen diskutiert werden. Unmittelbar nach der letzten oralen Verabreichung des Impfstoffs waren in keinem von 6 untersuchten Mäuseseren Antikörper nachzuweisen, 6 Tage danach

wurde in einem von 4 Seren ein Hämagglutinationstiter von 1 : 8 festgestellt. Auch STELLMACHER und MÜLLER (42), PIRINGER (29) und LODENKÄMPER (13) konnten in ihren Versuchen nur selten nach oraler Immunisierung humorale Antikörper gegen DC-Bakterien nachweisen; in einzelnen Fällen wurden geringe unwesentliche Titer beobachtet. Dies schien die frühere Meinung zu bestätigen, wonach die Teilnahme eines anderen als des zellulären Systems an dem Zustandekommen der Immunität nach oraler Impfung abgelehnt oder für unwesentlich gehalten wurde.

Einen wichtigen Hinweis darauf, daß aber doch nicht nur das zelluläre, sondern auch das humorale System am Immunitätsgeschehen beteiligt ist, lieferte LODENKÄMPER, der nach einer Immunisierungszeit von 40 Tagen wesentliche Agglutinititer gegen den eingegebenen Stamm E. coli 1000 feststellte (13). Nach 14tägiger Impfung waren noch keine Antikörper nachweisbar. PIRINGER konnte bei weißen Mäusen Agglutinine in der Widalschen Reaktion nachweisen, wenn die letzte orale DC-Fütterung mit dem Stamm 537 (O 127 : B 8) 3 bis 4 Wochen oder länger zurücklag (29).

Daß der Faktor Zeit eine nicht unbedeutende Rolle bei der Entstehung von nichtzellgebundenen Antikörpern spielt, zeigt auch die Beobachtung von RAUSS und KÉTYI, die 3 Tage nach oraler Immunisierung mit Shigellen Coproantikörper in der Darmwand, aber erst nach 7 bis 14 Tagen freie Antikörper im Blut nachweisen konnten (40).

MOCHMANN, OCKLITZ und Mitarbeiter konnten in Versuchen an Ratten und Kaninchen beinahe ausnahmslos spezifische Antikörper nach oraler Verabreichung eines DC-Impfstoffs des Serotyps O 111 nachweisen, wenn die Immunisierungsdosis hoch genug lag (17). Auch in Testreihen an Mäusen fanden diese Autoren nach oraler Immunisierung Antikörper in der indirekten Hämagglutinationsreaktion gegen den gleichen wie von uns benutzten DC-Stamm 2380 und gegen den DC-Stamm O 55 : K 59, wenn die Gabe der Antigene über eine längere Zeit erfolgte (20). Bei Verwendung der gemischten Hämadsorptionsreaktion nach FAGREUS wurde bei entsprechenden

Versuchen in den Seren ein wesentlich höherer Titeranstieg beobachtet (27). Nach oraler Impfung gegen Cholera und Ruhr wurden inzwischen ebenfalls humorale Antikörper nachgewiesen, auch hier war wieder die Empfindlichkeit der serologischen Meßmethode von Bedeutung (39). RAETTIG und BUSE haben mit einem Antigen von *S. typhi murium* gearbeitet, das sie einer großen Anzahl von Mäusen vergleichend subkutan und oral verimpften (39). Auch in ihren Versuchen konnten sie humorale Antikörper nach oraler Impfung nachweisen, allerdings waren diese Titerwerte 2 bis 3mal niedriger als bei den subkutan geimpften Tieren. Vor einiger Zeit schon berichteten RAUSS und KETTL, daß bei diesen beiden Impfmethoden gleich hohe Antikörpertiter erzielt werden, wenn oral eine 100mal so große Antigenmenge in derselben Zeit verimpft wird als subkutan (40). Außerdem machten RAETTIG und BUSE die folgende Beobachtung, daß nach oraler Impfung noch für eine längere Zeit als bei der subkutanen Impfung Resttiter zu finden sind (39).

Alle diese Befunde weisen darauf hin, daß nach oraler Immunisierung ein allgemeines Immunitätsgeschehen stattfindet und eine alleinige zelluläre lokalisierte Immunität nicht vorliegen kann.

Wie die verschiedenen Untersuchungen zeigen, spielen beim Nachweis von humoralen Antikörpern nach oraler Immunisierung zwei Faktoren eine wesentliche Rolle:

1. Die Ausführung der Impfung - Impfrhythmus und Dosis -, wobei nach größerer Dosis bzw. längerer Verabreichung des Impfstoffs von fast allen Autoren Antikörper gefunden werden;
2. die serologische Meßmethode.

Dazu sei berichtet, daß NUTER und Mitarbeiter Seren von Kindern auf Antikörper gegen DC O 26, O 55 und O 111 untersuchten (23). Mit Hilfe der gewöhnlichen bakteriellen Agglutination wurden nur in 3 von 323 Seren Agglutinine nachgewiesen, der durchschnittliche Titer dieser 3 Seren betrug 1 : 10. Mit dem Hämagglutinationstest waren dagegen

186 der 323 Seren positiv, außerdem betrug der Durchschnittstitel dieser 3 Seren nicht mehr 1 : 10, sondern 1 : 80. Es waren demnach Antikörper vorhanden, die mit der ersten Testmethode nicht zu erkennen gewesen waren. CCKLITZ und MOCHLMANN berichten von einer noch empfindlicheren Methode als der Hämagglutinationsreaktion, nämlich von der gemischten Hämadsorptionsreaktion nach FAGEPAUS (27). Es dürfte in Zukunft bei einer vorausgesetzt optimalen oralen Impfung im wesentlichen von der Empfindlichkeit der Meßmethode abhängig sein, Antikörper auch in geringen Mengen nachzuweisen.

Wie unsere Infektionsbelastungsversuche zeigten, ist auch, ohne daß wir nach oraler Impfung eindeutige humorale Antikörpertiter beobachten konnten, ein guter belastbarer Schutz vorhanden. Dies stimmt mit den früheren Ergebnissen, die von vielen Autoren bei der Schluckimpfung gegen verschiedene Krankheitserreger erzielt wurden, überein.

TORIKATA und IMAIZUMI hatten in ihren frühen Versuchen außerdem noch eine wichtige Beobachtung gemacht (44). Die immunisierten Meerschweinchen oral mit hitzeinaktivierten Colibakterien über 10 Tage und infizierten sie am 31. Tage nach der letzten Impfung subkutan mit lebenden Colibakterien. Dann prüften sie die Seren der so behandelten Tiere in Bezug auf eine Wirkung bei der Phagozytose von Colikeimen; es ließ sich eine hohe Phagozytoserate feststellen. Die Autoren erkannten, daß es zur Mobilisierung von Antikörpern gekommen sein mußte und schlossen daraus, daß die oral immunisierten Tiere eine allgemeine Serumimmunität erworben hatten.

Entsprechend konnte GWAN an Kaninchen nach intravenöser Belastung mit lebenden Colikeimen eine starke Vermehrung der Agglutinine im Serum der oral immunisierten Tiere nachweisen (8,9). Bei nochmaliger intravenöser Infektion wurde ein weiterer Anstieg der Agglutinine beobachtet. Diese serologischen Reaktionen wurden als Beweis für die

Entstehung einer allgemeinen Immunität nach oraler Immunisierung angesehen.

Auch wir haben einen Antikörperanstieg nach der Belastung gefunden. Betrug der durchschnittliche 3-Stunden-Titer der homolog behandelten Mäuse vor der intraperitonealen Infektion 1 : 2, so war er 6 Tage nach der Belastung auf 1 : 203 angestiegen. Dies darf wohl als Boostereffekt aufgefaßt werden. Unsere Befunde bestätigen damit die Ergebnisse von TORIKATA und IMAIZUMI sowie die von GWAN und bekräftigen die Auffassung, daß nach der oralen Impfung eine humorale allgemeine Immunität entsteht. Durch die Infektionsbelastung wurde ein Stimulans auf die in Abwehrbereitschaft stehenden Gewebe ausgeübt, das zu einer hohen Ausschüttung von humoralen Antikörpern führte. Dies steht in Übereinstimmung mit der früheren Aussage von RAETTIG, daß "nicht die im Blut meßbaren Antikörper den Grad der Immunität anzeigen, sondern daß das Vermögen Antikörper zu bilden, einen Teil der Immunität repräsentiert" (34). Diese Antikörper sind also sekundär in einem hochimmunen Organismus in großer Menge entstanden und als Folge eines starken spezifischen Reizes aufzufassen.

MOCHMANN, OCKLITZ und Mitarbeiter haben mit einer weit größeren Anzahl von Mäusen als in unseren Versuchen die beschriebenen Befunde vollauf bestätigt; sie arbeiteten wie wir mit dem DC-Stamm 2380 und immunisierten und infizierten in analoger Weise zu uns (20). Allerdings verwendeten sie als Antigen einen Natriumdesoxycholat-Extrakt, während wir einen hitzeinaktivierten Impfstoff benutzt hatten. Vor und nach Immunisierung sind von ihnen ebenso wie früher von uns nur geringe Antikörpermengen beobachtet worden, der Durchschnittstiter betrug am Ende der 10tägigen Immunisierungsperiode 1 : 2. 7 Tage nach der intraperitonealen Belastung war der durchschnittliche Hämagglutinationstiter auf 1 : 14 angestiegen. In einer zweiten Versuchsreihe verwendeten die Autoren den Stamm O 55 : K 59, hierbei wurde eine stärkere humorale Reaktion beobachtet,

denn der Titer war von 1 : 3 nach Immunisierung auf 1 : 33 nach Infektion angestiegen.

Als Vergleich seien hier noch die durchschnittlichen Antikörpertiter der Kontrolltiere gegen den DC-Stamm 2380 angegeben, die nur i.p. infiziert worden waren. Sie betrugen nach der Belastung bei MOCHMANN 1 : 5 und bei uns 1 : 8, damit waren sie eindeutig niedriger als die der Immuntiere.

Diese starke Boosterwirkung der Infektion bei der oralen Impfung wurde von RAETTIG und BUSE auch am *S. typhi murium* Infektionsmodell bestätigt (39). Sie immunisierten 10mal oral, infizierten 10 bzw. 17 Tage danach oral und erhielten vom 7. Tage post infectionem an einen starken Anstieg der Antikörper. Außerdem wurde beobachtet, daß der hohe Antikörperspiegel bis zum Versuchsende erhalten blieb. Hiermit stimmen auch die Befunde von MOCHMANN, OCKLITZ und Mitarbeitern überein, die 7 Tage nach i.p. Belastung den vorher erwähnten Titer von 1 : 14 und nach weiteren 7 Tagen einen solchen von 1 : 38 erzielt hatten. Allerdings kommt es nach einer späteren Belastung dann doch nicht mehr zu so einem starken Anstieg der Antikörpertiter, wie von beiden Forschergruppen übereinstimmend beschrieben wurde.

Aus all diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, daß "nicht die Höhe des Antikörpertiters im strömenden Blut zu irgendeiner Zeit, sondern sein Anstieg kurz nach einer homologen Infektion ein Gradmesser ist für die Bereitschaft der immunkompetenten Zellen zur Antikörperbildung und damit für einen Teil der belastbaren Immunität" (39).

Im folgenden soll die wichtige Frage besprochen werden, ob bei lokaler Anwendung des Antigens die Immunität breiter wird (33). Dazu waren in 4 Versuchen 200 Tiere mit dem DC-Serotyp O 125 : B 15 : H 19 immunisiert und mit dem Serotyp O 111 : B 4 : H 12 intraperitoneal infiziert worden. Wie die Zusammenfassung der 4 Einzelversuche zeigt, war die Mortalität bei den unspezifisch immunisierten

Mäusen gegenüber den Kontrolltieren um fast 25% gesenkt. Die statistische Sicherung ergab für den Echtheitsgrad der Differenz E einen Wert von 1,3, der aber hauptsächlich durch den erfolgreichen letzten Versuch bedingt war. Verglichen mit den spezifischen Tierversuchen bedeutet dies einen starken Abfall der Schutzwirkung, der Leistungsindex L^* beträgt nur 32.

Die Ursache für diese wenn auch geringe unspezifische Wirkung ist offensichtlich nicht in einer Antigengemeinschaft zu finden. Die beiden Impfstoffe hatten verschiedene O-, B- und H-A Antigene.

Betrachten wir nur den letzten Versuch aus dieser Reihe, bei dem die Mortalität nach der unspezifischen Immunisierung um etwa 70% gesenkt war, so erzielten wir hier ein beinahe gleich gutes Ergebnis wie bei dem entsprechenden spezifischen Versuch. Wie schon vorher ausgeführt, könnte die Ursache für dieses gute Ergebnis in der geringen Belastung in diesem Versuch zu finden sein, die Kontrollen hatten hier die niedrigste Mortalitätsrate aller 4 Versuchsreihen. Eine unspezifisch erzielte Schutzwirkung hat sich möglicherweise infolge der geringen Infektionsbelastung nachweisen lassen. Auf der anderen Seite hätte eine zu große Belastung in den 3 schlechteren Versuchen den unspezifischen Schutzeffekt durchschlagen. Diese Annahme läßt sich auch durch die Versuchsergebnisse von MOCHMANN, OCKLITZ und Mitarbeitern bekräftigen (19). Sie immunisierten in der üblichen Versuchsanordnung in 4 verschiedenen Reihen mit jeweils einem Natriumdesoxycholat-Extrakt der O-Gruppe 26, 55, 127 und mit einem Normalcoli-Stamm der O-Gruppe 2 und belasteten mit dem DC-Stamm 2380 (O 111). Im zuletzt genannten der 4 Versuche war die

* $L = \frac{\text{Wirkungsindex der unspezifischen Impfung}}{\text{Wirkungsindex der spezifischen Impfung}} \times 100$

$$L = \frac{23,8}{73,6} \times 100 \quad L \approx 32$$

Mortalität bei den Kontrolltieren am niedrigsten, sie betrug 90,2%. Es wurde hier der beste Wirkungsindex von 20,1 erzielt, das entspricht etwa unserem Ergebnis. In den ersten 3 Ansätzen konnten sie eine eventuelle unspezifische Schutzwirkung nicht nachweisen. Die Mortalität der Kontrollen war aber hierbei höher, sie schwankte zwischen 93,7% und 100%. Es erscheint also unbedingt wichtig, die Größe der Belastung bei einem Urteil über die unspezifische Wirkung einer oralen Impfung zu berücksichtigen.

RAETTIG zeigt anhand verschiedener Versuche mit Salmonellen, daß "unter bestimmten Bedingungen eine orale Immunisierung mit Antigenen möglich ist, die nicht zu derselben Bakterien-spezies gehören wie der infizierende Keim" (36). In diesen Versuchen wurde oral immunisiert und anschließend, anders als bei uns (heterolog i.p.), heterolog oral infiziert. Der Leistungsindex, der hierbei erlangt wurde, lag zwischen 54 und 86, war damit also wesentlich besser als der hier beschriebene von 32.

Der durch die orale Belastung geprüfte Schutz ist demnach viel unspezifischer als der in den Coliversuchen nach intraperitonealer Infektion. Durch die orale Verabfolgung war der infizierende Keim primär mit der Darmschleimhaut in Kontakt gekommen, und es ergab sich daher die Annahme, daß die unspezifische Abwehrkomponente vor allem hier zu suchen ist (36). Auf diesen Punkt soll später bei der Betrachtung der Antikörper noch einmal eingegangen werden.

Hier sei noch die Beobachtung von STELLMACHER und MÜLLER eingefügt, die von der erfolgreichen Anwendung einer monovalenten Colivakzine bei der Colienterotoxämie von Schweinen berichten, obwohl diese Erkrankung auch mit Colikeimen anderer serologischer Gruppen in Zusammenhang steht (42).

Wenden wir uns nun der Betrachtung der gemessenen Häm-agglutinationstiter zu, so läßt sich folgendes feststellen:

Die mit dem Behring-Impfstoff immunisierten Mäuse hatten unmittelbar nach dem letzten Immunisierungstag und nach weiteren 6 Tagen keine humoralen Antikörper gegen den heterologen Stamm *E. coli* 2380 gebildet. Nur einmal wurde bei 6 untersuchten Seren ein unsicherer Titer von 1 : 8 festgestellt. In Bezug auf eine Antikörperbildung gegen diesen Stamm unterschieden sie sich also nicht von den Mäusen, die den Stamm *E. coli* 2380 zur Immunisierung erhalten hatten. Es wäre aber durchaus denkbar, daß gegen den Behring-Impfstoff gerichtete Antikörper aufgetreten waren. Wir untersuchten nur auf Antikörper gegen das infizierende Antigen (*E. coli* 2380).

6 Tage nach der Infektion betrug der durchschnittliche H.A.-Titer 1 : 4, bei einem von 9 Tieren sogar 1 : 64 (es wurde leider versäumt, die Seren aus dem vierten unspezifischen Versuch auf Antikörper zu testen). Die Überlebenden Kontrolltiere zeigten zu diesem Zeitpunkt etwa gleich hohe Werte. Die bei dieser Versuchsgruppe nachgewiesenen Antikörper dürften die Folge einer überstandenen Infektion sein, d.h. sie sind Ausdruck für eine durch die Infektion aktiv erworbene Immunität. Sollte in diesem Sinne auch die Antikörperbildung bei den unspezifisch immunisierten Versuchstieren verstanden werden? Wenn wir dies annehmen, dann muß aber auf eine Diskrepanz hingewiesen werden, nämlich auf die um etwa 25% gesenkte Mortalität bei den Immuntieren. Es soll im weiteren versucht werden, diesen Unterschied zu klären.

Die vorher erwähnte Überlegung läßt sich auf die unspezifischen Versuche übertragen. Das durch die Infektion eingebrachte Antigen (*E. coli* 2380) trifft auf Gewebe, die durch das heterologe Antigen (Behring-Impfstoff) in eine Abwehrspannung gebracht worden sind. Entsprechend den spezifischen Versuchen könnte es hier zu einem Abfangen der heterologen Keime gekommen sein. Dies würde einen unspezifischen Abwehrmechanismus in dem Darmepithel bzw. in anderen Geweben zur Voraussetzung haben müssen. Der Unterschied zu den spezifischen Versuchen besteht nun darin,

daß es nicht bzw. nur verzögert oder in sehr geringem Grade zur Bildung von spezifisch gegen das infizierende Antigen gerichteten humoralen Antikörpern kommt. Die Folge ist, daß für eine Entgiftung des Organismus praktisch nur die Gewebe zur Verfügung stehen. Daß dieser Schutzeffekt nicht immer ausreicht, ist an der gesteigerten Mortalität der unspezifisch immunisierten Versuchstiere im Vergleich mit der der spezifisch immunisierten zu erkennen. Daß er aber in manchen Fällen genügt, ist an der geringeren Mortalität der unspezifisch geimpften Mäuse gegenüber der der Kontrollen zu sehen. Das Fehlen höherer Antikörpertiter nach Infektion würde in dieses Schema passen.

Auch die folgende Beobachtung von MOCHMANN, OCKLITZ und Mitarbeitern widerspricht nicht dieser Annahme (20). Sie immunisierten Mäuse oral bivalent mit Antigenen aus DC O 55 und O 111 und erzielten nach i.p. Belastung mit O 55 extrem hohe Antikörpertiter gegen diesen Stamm (Durchschnittswert 1 : 623), während gleichzeitig der Titer gegen den heterologen Stamm O 111 nur 1 : 3 betrug. Erst nach einer bivalenten Belastung trat auch gegen O 111 ein Titeranstieg auf. Dies wurde als Beweis für die Spezifität des Belastungseffektes angesehen.

Die oben angenommene Voraussetzung eines unspezifischen Schutzes in den Geweben des Körpers stimmt aber nicht mit der Feststellung von GÜNTHER überein, nach der die sog. Gewebeimmunität die Eigenschaften einer spezifischen Immunreaktion ohne nachweisbare freie Antikörper hat (7). RAETIG dagegen spricht schon seit langem von einem unspezifischen Schutz, der in der Darmschleimhaut nach oraler Immunisierung aufgebaut wird. Vielleicht könnten beide Feststellungen folgendermaßen in Einklang gebracht werden: Durch eine lokale Immunisierung entsteht erstens ein unspezifischer Schutz im primär empfänglichen Gewebe (in diesen Versuchen in der Darmschleimhaut) und zweitens ein spezifischer in anderen Systemen. Beide Schutzeffekte hätten sich in den beschriebenen spezifischen Versuchen addiert

und zu einer hohen Immunitätslage geführt, während bei den unspezifischen Tierversuchen praktisch nur der Schutz in der Darmschleimhaut in Anspruch genommen werden konnte.

Nachdem wir versucht hatten, an Mäuseversuchen die Grundlagen für eine orale Immunisierung mit inaktivierten DC-Bakterien zu schaffen, wandten wir uns den Untersuchungen am Menschen zu. Da wir beobachtet hatten, daß wir bei den Immunisierungsversuchen an Mäusen von einem Nulltiter ausgegangen waren, war es interessant die Frage zu prüfen, ob dies auch beim Menschen der Fall sein würde.

Es wurden von uns insgesamt 105 Seren von Personen beiderlei Geschlechts im Alter von 20 bis 45 Jahren auf Normalantikörper gegen den DC-Serotyp O 125 : B 15 : H 19 untersucht. In allen Fällen war das Ergebnis eindeutig positiv. Neben anderen konnten MERÉTEY und BACKHAUSZ bei einer weit größeren Anzahl von Personen Antikörper gegen die Serotypen O 26, O 55, O 86 und O 111 in einer Häufigkeit von 80% bis 97% nachweisen (16). Dies zeigt eine weitgehende Durchseuchung mit DC-Bakterien an. Es darf wohl angenommen werden, daß diese spezifisch bedingt ist, denn bei der hohen Infektiosität und der weiten Verbreitung der Keime ist anzunehmen, daß viele Menschen im Verlauf ihrer Kindheit mit DC-Bakterien in Berührung kommen. Außer der Infektionskrankung beim Kleinkind bedeutet wahrscheinlich auch das DC-Trägertum oder die stumme Erkrankung ohne klinische Symptome einen Antigenreiz, der zur spezifischen Antikörperbildung führt. Zahlreiche Forscher haben enteropathogene Colitypen im Stuhl von gesunden Kindern und Erwachsenen nachgewiesen (16). POLANETZKI und KÜHLWEIN berichten, daß bei 8773 routinemäßigen Stuhluntersuchungen von Kindern unter 5 Jahren in 2470 Fällen (28,6%) ein Befall mit DC-Keimen gefunden wurde, der mit enteritischen Symptomen verbunden war (31).

Aus der Häufigkeit der Coliantikörper in Erwachsenenserum

vermuten MERÉTEY und BACKHAUSZ, daß die Antigenwirkung der DC-Bakterien auch nach dem Säuglingsalter zur Geltung kommt (16). Diese Annahme kann später durch eigene Versuche bekräftigt werden.

Betrachten wir jetzt das Auftreten von Antikörpern in Abhängigkeit vom Alter. Die von uns getesteten 50 Seren von Schwangeren, ihr Alter lag zwischen 20 und 45 Jahren, hatten einen durchschnittlichen H.A.-Titer von 1 : 94 und lagen damit sogar noch über dem Wert von 1 : 60 bei gleichaltrigen männlichen Testpersonen. Dieses Ergebnis weist allerdings keine Signifikanz auf. Trotz dieses eindeutigen Vorhandenseins von Antikörpern gegen den Serotyp O 125 bei Schwangeren, wurden von MERÉTEY und BACKHAUSZ bei Neugeborenen nur in 9% bis 15% der Fälle Antikörper beobachtet, allerdings gegen die oben erwähnten anderen Serotypen. Um diese Diskrepanz zu klären und einen genauen Einblick in die diaplazentare Übertragung von DC-Antikörpern zu bekommen, sind serologische Untersuchungen an Müttern und deren Neugeborenen durchgeführt worden. NETER und Mitarbeiter testeten die Seren von 26 Müttern und die entsprechenden Nabelschnurseren auf Antikörper gegen O 26, O 55 und O 111 (23). In fast allen Seren der Frauen wurden Antikörper gegen diese 3 Serotypen gefunden, dagegen hatten nur 3 Kinder Titerwerte. In diesen 3 Fällen war der mütterliche Titer 4 bis 16mal höher als der kindliche. Mit zunehmendem Alter kommt es dann zu vermehrt positiven Befunden, wurden im 1. Trimenon nur zu 7% bis 13% Antikörper gefunden, so waren bei Kindern über 12 Jahren zu 93% bis 98% Antikörper vorhanden.

Etwas entsprechende Ergebnisse erzielte SUSSMAN: in allen 27 untersuchten mütterlichen Seren waren Antikörper gegen O 111 : B 4, die Titer im Trypsin-Hämagglutinationstest lagen zwischen 1 : 8 und 1 : 4096 (43). Aber nur in 5 Nabelschnurseren wurden positive Befunde festgestellt, die Titer betrugen 1 : 4 bis 1 : 32. Es war hierbei aber keine Beziehung zwischen der Höhe des Titers bei der Frau und

der An- oder Abwesenheit von Antikörpern bei dem Kind zu finden. Eine diaplazentare Übertragung von DC-Antikörpern kommt also nur relativ selten vor. Auch LODINOVA, JOUJA und LANC berichten, daß nur niedrige Antikörpermengen gegen E. coli auf das Kind übertragen werden (14). Die Ursache dafür ist nach Ansicht verschiedener Autoren wie SUSSMAN (43), WEINGÄRTNER (46) u.a. darin zu finden, daß die Coliantikörper einer bestimmten Eiweißfraktion im Gamma-Globulinbereich angehören, die die Plazenta nur schlecht passieren kann.

Der kindliche Organismus muß also die immunbiologische Erfahrung einer DC-Infektion selbst durchmachen. In solchem Fall kommt es entweder zu einer Enteritis oder zu einer symptomlosen Infektion, jedenfalls tritt ein Immunitätsgeschehen im Makroorganismus ein. Der serologische Ausdruck hierfür ist das Auftreten von Antikörpern. MOCHMANN, OCKLITZ und Mitarbeiter warnen in diesem Zusammenhang vor einer Überbewertung der humoralen Antikörper (18). Sie betonen die größere Wichtigkeit der lokal produzierten Antikörper in der Darmschleimhaut und der Coproantikörper. Humorale Antikörper seien nur von diagnostischer Bedeutung; sie seien der Ausdruck einer stattgefundenen Infektion mit DC-Bakterien (24). Sie bedeuten wohl aber keine Immunität, wie auch die Versuche von HIROKI zeigen: Es wurden 2 Kinder mit den DC-Keimen infiziert, die bei ihrer ersten Erkrankung aufgetreten waren, und es ließ sich keine Immunität nachweisen (10). Auch PLACHY führt an, daß humorale Antikörper bei Kindern auf eine durchgemachte Infektion hinweisen, aber keinen Schutz bedeuten (30). Da nun die Anfälligkeit gegen die infektiöse Enteritis im 1. Trimenon besonders stark ist und sehr schwere Verlaufsformen gerade in diesem Alter auftreten, könnte nach RAETTIG (38) durch eine frühzeitige orale Impfung die natürliche Immunisierung nachgeahmt werden, und zwar gesteuert und kontrollierbar, was auch MOCHMANN und OCKLITZ für wesentlich halten (18).

Wie nun unsere Immunisierungsversuche zeigten, reagierte der menschliche Organismus in 10 von 12 Fällen akut mit einer humoralen Antikörperbildung nach einem oralen Antigenreiz. Diese spontane Beantwortung beim Menschen steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Tierversuchen. Zur Erklärung des Unterschiedes können zwei Gründe angeführt werden: Der erste ist in der Verschiedenartigkeit der Individuen zu sehen und der zweite in der Tatsache, daß beim Menschen schon vor Immunisierung Antikörper vorhanden waren; das bedeutet, daß hier von einer höheren Immunitätslage ausgegangen wurde. Überträgt man jetzt die allgemeine Annahme, nach der durch eine orale Impfung primär zelluläre und sekundär humorale Antikörper entstehen, auf den Menschen, so kann aus dem schnellen und starken Anheben des Antikörperspiegels vermutet werden, daß die primäre zelluläre Reaktion sehr früh und wohl auch sehr heftig einsetzte, d.h. daß eine starke Immunreaktion stattgefunden haben muß. Besonders groß scheint diese bei den Kindern bis zum Alter von 1,4 Jahren gewesen zu sein, denn sie zeigten von allen Kindern den relativ stärksten Anstieg humoraler Antikörper nach oraler Impfung. Es handelte sich gleichzeitig um die Kinder, die vor Immunisierung die niedrigsten Titer aufwiesen.

In jeweils 2 von 3 Serien von Kindern über 5 Jahren und Erwachsenen war ein nicht ganz so starker Antikörperanstieg zu verzeichnen. Die Antigenwirkung von DC-Bakterien scheint also auch noch in einem Alter zur Geltung zu kommen, in dem nur selten DC-Infektionserkrankungen beobachtet werden.

Die Tatsache, daß in 2 Fällen die H.A.-Titer nicht anstiegen, läßt als mögliche Ursache eine verminderte Passage des Antigens durch die Darmschleimhaut zu. Denn nach RAETTIG entstehen Antikörper nur dann, wenn eine genügende Antigenmenge durch die Schleimhaut gelangt ist (33). Die hohe Dosierung von insgesamt 20 Kapseln des Behring-Impfstoffs im Selbstversuch führte zum relativ höchsten

Titeranstieg. Die Kinder beantworteten die **Immunisierungs-**dosis von 10 Kapseln mit einem schwächeren Anstieg und nach Verabreichung von nur 5 Kapseln an 2 weitere Erwachse-
ne kam es in einem Fall zu einem geringen Anheben des Ti-
ters, im anderen Fall blieb eine Reaktion ganz aus.

Bei den Immunisierungsversuchen von **LODENKÄMPER** erhielten Patienten über längere Zeit täglich oral 1 - 5 g nicht besonders abgetötete *E. coli* 1000-Bakterien in Pasten-
bzw. Pulverform (13). Es kam zur Bildung von Agglutininen mit Seruntiter zwischen 1 : 800 und 1 : 3200, nach sehr langer Impfung zu einem Titer von 1 : 51000. Es wird auch hier eine Abhängigkeit der Titerhöhe von der Immunisierungs-
dosis deutlich, wie es auch an den Mäuseversuchen von ver-
schiedenen Autoren gezeigt werden konnte.

Daß es möglich ist, schon sehr früh die Bildung von humo-
ralen Antikörpern in Gang zu bringen, zeigen die Versuche von **LODINOVÁ** und Mitarbeitern (14). Sie verabfolgten Neu-
geborenen nichtpathogene Colikeime vom Typ 083 oral, es handelte sich allerdings um lebende Bakterien, während wir hitzeinaktiviertes Antigen verwendet hatten. Die erste Gabe fand in den ersten 2 Stunden nach der Geburt statt, es wurde in einem Zeitraum von 4 Wochen insgesamt 12mal oral geimpft. Antikörper gegen *E. coli* 083 wurden erst-
mals 14 Tage nach der Geburt festgestellt und stiegen auf einen hohen Wert an.

Ob es nun tatsächlich durch die orale Impfung mit hitze-
inaktivierten DC-Bakterien beim Menschen zu einer Erhö-
hung der Immunitätslage gekommen ist, läßt sich natürlich nicht beweisen. Hierüber kann nur ein Infektionsbelastungs-
versuch bzw. ein Feldversuch eindeutig Auskunft geben. Wir hatten aber in den Versuchen mit Mäusen gesehen, daß feh-
lende oder geringe H.A.-Titer nach Immunisierung nicht gleichbedeutend mit einer mangelnden Immunität sind, son-
dern daß im Gegenteil sehr wohl ein hochgradiger Schutz gegenüber einer Infektion besteht. So könnten die humoralen

Antikörper, die beim Menschen nach Impfung aufgetreten sind, vielleicht gerade auf eine starke Immunisierung hinweisen und einen hochgradigen Schutz bedeuten.

Es fiel auf, daß bei fast allen Kindern der H.A.-Titer 1 bis 2 Wochen nach der letzten oralen Impfstoffeinnahme wieder auf den Ausgangswert gesunken war. Ist damit ein durch die Immunisierung eventuell hervorgerufener Schutzeffekt schnell verlorengegangen? Auch zur Lösung dieser Frage ist ein Infektionsbelastungsversuch bzw. ein Feldversuch notwendig. STELLMACHER und MÜLLER deuten auf eine nur kurze Dauer des Impfschutzes hin und schlagen deshalb vor, noch einmal zu impfen (42). MOCHMANN, OCKLITZ und Mitarbeiter berichten dagegen, daß in ihren Mäuseversuchen nach 10maliger oraler Verabreichung des Natriumdesoxycholat-Extraktes aus DC 0 111 ein Schutz für mindestens ein halbes Jahr besteht, obwohl gleichzeitig die serologischen Reaktionen nach Belastung mit der Zeit deutlich abnehmen (21). Ebenso konnte RAETTIG bei der Salmonellen-Enteritis der weißen Maus noch für längere Zeit einen Schutzeffekt nach oraler Immunisierung nachweisen (38), obwohl Antikörper mit der Zeit seltener zu finden waren und niedrigere Titer zeigten (39). Auch LUMIÈRE und CHEVROTIER (15) konnten in ihren frühen Versuchen eine Immunität noch 4 Monate nach Immunisierung nachweisen; TORIKATA und IMAIZUMI (44) sowie GWAN (8) sprechen von einem monatelangen Impfschutz nach oraler Immunisierung.

Im Rahmen der Untersuchungen am Menschen kamen wir also zu dem Resultat, daß nach oraler Impfung eine Reaktion im Organismus eingetreten ist, was an dem Antikörperanstieg abzulesen war. Der Impfstoff war demnach resorbiert worden. Weiter war wichtig zu beobachten, daß der Impfstoff gut vertragen wurde; es traten keine allergischen oder toxischen Symptome auf. Unsere Ergebnisse sind gedacht als Unterstützung für weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der oralen Impfung mit inaktivierten DC-Bakterien.

Inzwischen ist von SCHREIBER an 3 Westberliner Kinderkrankenhäusern hierzu ein Feldversuch unternommen worden (41). Als Impfstoff wurde ein polyvalenter Impfstoff mit inaktivierten DC-Keimen gegen O 26, O 55, O 111, O 128 und O 125 verwendet. Mehr als 1100 Kinder bekamen ihn verabreicht, es wurde an 5 aufeinander folgenden Tagen oral geimpft. Es wird von einer spezifischen und auch von einer unspezifischen Infektionsprophylaxe berichtet, denn bei den immunisierten Kindern traten viel weniger und in ihrem Verlauf schwächere Anstaltsdyspepsien auf - bedingt durch DC-Bakterien bzw. ECHO-Viren - als bei den nichtimmunisierten. Eine unspezifische Schutzwirkung ließ sich bei Kindern mit Salmonellenerkrankungen nachweisen, denn erstens wurde die Rezidivhäufigkeit gesenkt und zweitens ein Dauerausscheidertum verhindert.

Da nur wenige Kinder an einer DC-bedingten Dyspepsie litten, konnten keine eindeutigen Beweise für einen spezifischen Impfschutz erbracht werden. Doch wird von der bakteriologischen Sanierung eines DC O 114-Ausscheiders berichtet, bei dem eine Therapie mit Antibioticis nicht zu einem Verschwinden der Keime im Stuhl geführt hatte. Erst die orale Verabreichung einer Autovakzine, die in Unterbrechung über mehr als 2 Monate gegeben wurde, führte zu diesem positiven Ergebnis.

Wir selbst konnten einen ähnlichen Hinweis auf die gute Wirkung der oralen Impfung beim Menschen bemerken. Ein Patient, der an einer durch Colibakterien hervorgerufenen Pyonephrose schwer erkrankt war, wurde insgesamt 60 Tage lang unter Impfschutz mit einer Autovakzine gehalten. Vor Beginn dieser Therapie war der Patient chirurgisch versorgt und mit Antibioticis behandelt worden. Der Allgemeinzustand hatte sich daraufhin etwas gebessert, es trat aber immer noch intermittierendes Fieber auf, im Urin wurden weiterhin große Bakterienmengen nachgewiesen. Nach der Verabreichung der Autovakzine verschwanden diese klinischen Symptome. Da der Kranke die ersten 20 Tage neben dem Impfstoff auch weiterhin die Antibiotika verab-

folgt bekommen hatte, wäre eine eindeutige Aussage über die gute Wirksamkeit der oralen Impfung verfrüht. Bei Betrachtung der mit der Widalschen Reaktion nachgewiesenen Antikörpertiter darf bekanntlich aus deren Höhe und Verlauf nicht auf die im Körper vorhandenen Abwehrkräfte geschlossen werden. Es fiel folgendes auf: Nach Unterbrechung der oralen Impfstoffzufuhr nach den ersten 20 Tagen stieg der Antikörpertiter an. Nach Wiedereinsetzen der Therapie nach 3 Wochen kam es dagegen zum steilen Abfall des Titers. Diese Titerbewegung im Krankheitsverlauf entspricht der Beobachtung von BRAUN und Mitarbeitern, wonach während einer durch Colibakterien verursachten Erkrankung ein Titeranstieg und nach der Erkrankung ein Abfall desselben auftritt (1).

Die Versuche an Mäusen können nur als Modellversuche aufgefaßt werden, denn die intraperitoneale Infektion bei den Tieren ist nun einmal nicht analog zum Mechanismus der oralen DC-Infektion beim Menschen, auch wenn die intraperitoneale Belastung für die Maus einen viel stärkeren Stress bedeutet als die orale Infektion für den Menschen (26).

Um die für eine Anstaltsendemie wichtige Frage zu entscheiden, ob durch die Schluckimpfung ein genügender Schutz erzielt werden kann, sollten Neugeborene und Säuglinge prophylaktisch und therapeutisch mit inaktivierten Dyspepsiecoli-Bakterien geimpft werden.

E. Zusammenfassung

1. An 294 weißen Mäusen, die mit inaktivierten Dyspepsiecoli-Bakterien des Stammes O 111 10 Tage lang oral immunisiert und 7 Tage danach homolog intraperitoneal infiziert wurden, konnte die gute Wirksamkeit der oralen Immunisierung bestätigt werden.

2. Bei oraler Immunisierung von 200 weißen Mäusen mit dem Dyspepsiecoli-Serotyp O 125 und heterologer intraperitonealer Infektion mit dem Serotyp O 111 war nur ein geringer Schutzeffekt zu beobachten.
3. Die serologischen Untersuchungen mit Hilfe der indirekten Hämagglutinationsmethode zeigten vor und unmittelbar nach dem letzten Immunisierungstag keine Antikörper in den Mäuseseren. Nach 7 Tagen konnte nur in wenigen Seren ein Antikörperspiegel festgestellt werden; dieser war dann sehr niedrig. 6 Tage nach Infektion stiegen die Titer bei den homolog behandelten Tieren steil an. Die unspezifisch immunisierten Mäuse und die Kontrolltiere wiesen im Vergleich dazu nur sehr geringe Antikörperanstiege auf.
4. In 55 Seren von männlichen Blutspendern und in 50 Schwangerseren wurden in 100% Häufigkeit Normalantikörper gegen den Dyspepsiecoli-Serotyp O 125 festgestellt.
5. Es wird berichtet, daß es im menschlichen Organismus durch Einbringen eines Antigens auf oralem Wege zu einer immunologischen Reaktion gekommen ist. In 10 von 12 Seren von Kleinkindern und Erwachsenen war nach Verabreichung eines inaktivierten Dyspepsiecoli-Impfstoffs vom Stamm O 125 ein früh einsetzender Anstieg der Hämagglutinationstiter festzustellen. Nach ein bis zwei Wochen fielen diese wieder auf den Ausgangswert zurück.
6. An einem Patienten, der an einer durch Colibakterien bedingten Pyonephrose erkrankt war, wurde eine oral eingegebene Autovakzine anscheinend erfolgreich angewendet.

F. Literatur

1. BRAUN, O.H.,
SEELIGER, H.,
WAGNER, N. Agglutininnachweis im Rekonvaleszenten-
serum von Säuglingen mit infektiöser Coli-
enteritis. Z.Kinderheilk. 75, 50(1954/55)
2. BRAUN, O.H. Escherichiosen. In OPITZ, H. und SCHMID, F.:
Handbuch der Kinderheilkunde, Band V, 402
Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963
3. BREUEL, H.-P. Lokale Immunisierung mit nichtvermehrungs-
fähigen Mikroorganismen oder ihren Anti-
genen. Inaug. Diss. Freie Universität
Berlin 1969
4. BRODHAGE, H. Harnstoff-Extrakte aus gramnegativen Bak-
terien in der indirekten Hämagglutinations-
reaktion. I. Mitteilung : Harnstoff-Ex-
trakte aus S.typhi, paratyphi-B, cholerae
suis und Shig. sonnei. Z. Hyg. Infekt.-Kr.
148, 94 (1961/62)
5. DOMINGO, P.,
VIDAL, J. Typhusimpfung "per os" . Rev.méd.de Barce-
lona 5, 465 (1926)
6. GOLOVANOFF, M. De la vaccination anticolibacillaire. Etude
de l'immunité locale. C.R.Soc.Biol.(Paris)
98, 660 (1928)
7. GÜNTHER, O. Die "Gewebeimmunität" im Stufenschema der
Immunität. Zbl.Bakt. I. Orig. 198, 181(1965)
8. GWAN, O.S. Recherches sur l'immunité anticolibacil-
laire, (Premier mémoire). Z.Immun.-Forsch.
93, 248 (1938)

9. GWAN, O.S. Recherches sur l'immunité anticolibacillaire, (Deuxième mémoire). Z.Immun.-Forsch. 93, 278 (1938)
10. HIROKI, H. zitiert nach BRAUN, O.H.: Escherichiosen. In OPITZ, H. und SCHMID, F.: Handbuch der Kinderheilkunde, Band V, 402, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963
11. KOLLER, S. Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen, Dresden 1943
12. LIETZ, B.,
 RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 5.Mitteilung: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Dyspepsiecoli-Infektionen. Zbl.Bakt. I.Orig. 204, 543 (1967)
13. LODENKÄMPER, H. Über das Problem der oralen Immunisierung. Wien.med.Wschr. 114, 860 (1964)
14. LODINOVÁ, R.,
 JOUJA, V.,
 LANG, A. Experimentelle Besiedlung des Darmtrakts von Neugeborenen mit dem E. coli-Typ 083 und Untersuchungen über die Bildung von Antikörpern. Z.Immun.-Forsch. 133, 229 (1967)
15. LUMIÈRE, A.,
 CHEVROTIER, J. Sur la vaccination antityphique par voie gastrointestinale. C.R.Acad.Sci. (Paris) 158, 197 (1914)
16. MERÉTEY, K.,
 BACKHAUSZ, R. Untersuchung von E. coli-Antigenen und Antikörpern mit passiver Hämagglutinations-Mikromethode. Ann.Immunol.Hung. 6, 104 (1963)

17. MOCHMANN, H.,
OCKLITZ, H.W.,
SCHMIDT, E.F.,
HERING, L.,
MARKUSE, I. Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natriumdesoxycholol-Extrakt aus Dyspepsiecoli-Stämmen. II. Mitteilung : Immunbiologische Eigenschaften. Die Antikörperbildung im Versuchstier und der passive Schutzversuch. Zbl.Bakt. I.Orig. 203, 307 (1967)
18. MOCHMANN, H.,
OCKLITZ, H.W.,
SCHMIDT, E.F.,
HERING, L.,
MILLECK, J. Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natriumdesoxycholol-Extrakt aus Dyspepsiecoli-Stämmen. III. Mitteilung: Die Schutzwirkung des Extraktes im aktiven Mäuseschutzversuch. Zbl.Bakt. I.Orig. 203, 314 (1967)
19. MOCHMANN, H.,
OCKLITZ, H.W.,
HERING, L.,
SCHMIDT, E.F.,
RICHTER, U. Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natriumdesoxycholol-Extrakt aus Dyspepsiecoli-Stämmen. V. Mitteilung : Die Gruppenspezifität der Schutzwirkung und der Schutzeffekt einer bivalenten Immunisierung im aktiven Mäuseschutzversuch. Zbl.Bakt. I.Orig. 206, 63(1968)
20. MOCHMANN, H.,
OCKLITZ, H.W.,
SCHMIDT, E.F.,
RICHTER, U.,
HERING, L. Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natriumdesoxycholol-Extrakt aus Dyspepsiecoli-Stämmen. VII. Mitteilung: Serumantikörper in der indirekten Hämagglutinationsreaktion bei immunisierten und belasteten Mäusen. Zbl.Bakt. I.Orig. 208, 58 (1968)

21. MOCHMANN, H.,
OCKLITZ, H.W.,
HERING, L.,
SCHMIDT, E.F.,
RICHTER, U. Laboratoriumsversuche über die Möglich-
keiten einer oralen Immunisierung mit
einem Natriumdesoxycholatl-Extrakt aus
Dyspepsiecoli-Stämmen. IX.Mitteilung :
Die Dauer des mit dem Extrakt im aktiven
Mäuseschutztest erzielten Schutzes. Zbl.
Bakt. I.Orig. 209, 325 (1969)
22. NAKAGAWA, S.,
SHAKUDO, M. Immunisation du tube digestif par voie
buccale. Arch.chir.japon. 8 (1931)
(Bull.Inst.Pasteur 29, 1115 (1931))
23. NETER, E.,
WESTPHAL, O.,
LÜDERITZ, O.,
GINO, R.M.,
GORZYNSKI, E.A. Demonstration of Antibodies against Enteric
pathogenic Escherichia Coli in Sera of
Children of Various Ages. Pediatrics 16,
801 (1955)
24. OCKLITZ, H.W. Dyspepsiecoli. Dtsch.med.Wschr. 90, 214
(1965)
25. OCKLITZ, H.W.,
MOCHMANN, H.,
SCHMIDT, E.F.,
HERING, L.,
MARKUSE, I. Laboratoriumsversuche über die Möglich-
keiten einer oralen Immunisierung mit
einem Natriumdesoxycholatl-Extrakt aus
Dyspepsiecoli-Stämmen. I.Mitteilung :
Immunbiologische Eigenschaften. Die Anti-
körperbindung des Extraktes im Latextest.
Zbl.Bakt. I.Orig. 203, 300 (1967)
26. OCKLITZ, H.W.,
MOCHMANN, H.,
SCHMIDT, E.F.,
MARKUSE, I.,
SCHUBARTH, H. Laboratoriumsversuche über die Möglichkei-
ten einer oralen Immunisierung mit einem
Natriumdesoxycholatl-Extrakt aus Dyspepsie-
coli-Stämmen. VI.Mitteilung: Der Einfluß
der oralen Immunisierung auf die Ausschei-
dung von oral eingegebenen Dyspepsiecoli-
keimen bei der weißen Maus. Zbl.Bakt. I.
Orig. 207, 27 (1968)

27. OCKLITZ, H.W.,
MOCHMANN, H.,
HERING, L.,
SCHMIDT, E.F.,
RICHTER, U. Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natriumdesoxycholat-Extrakt aus Dyspepsiecoli-Stämmen. VIII.Mitteilung : Serumantikörper in der gemischten Hämadsorptionsreaktion nach FAGREUS bei immunisierten und belasteten Mäusen. Zbl.Bakt. I.Orig. 209, 161 (1969)
28. PETERSON, W.S.,
ALISSOFF, P.A.,
WEDENJAPIN, S.A. Über enterale Immunisierung gegen infektiöse Darmerkrankungen mit einer Pentavakzine (Dysenterie Shiga, Flexner, Y, Proteus vulgaris und B.coli). Wratschebnoje Delo 1924, No. 20/23
29. PIRINGER, W.A. Orale Immunisierung weißer Mäuse durch Dyspepsiecoli. Zbl.Bakt.I.Orig. 196, 463(1965))
30. PLACHY, V. zitiert nach OCKLITZ, H.W.: Dyspepsiecoli. Dtsch.med.Wschr. 90, 214 (1965)
31. POLANETZKI, U.,
KÜHLWEIN, I. Dyspepsiecolibefunde am Hygiene-Institut Frankfurt/Main in den Jahren 1957-1960. Z.Kinderheilk. 86, 160 (1961/62)
32. RAETTIG, H. Untersuchungen zur Immunität und Serologie der Influenza. I.Mitteilung. Die Agglutinationsmethode nach HIRST und ihre Ergebnisse beim gesunden Menschen. II.Mitteilung. Der Agglutinationstiter bei Krankheiten des Menschen. Zbl.Bakt.I.Orig. 152, 159 (1947)

33. RAETTIG, H. Die lokale Immunisierung mit inaktivierten Antigenen gegen bakterielle Darminfektionen (Typhus, Paratyphus, Cholera, Ruhr). Zbl. Bakt.I.Ref. 183, 1 (1962)
34. ders. Die aktive Immunisierung, gestern, heute und morgen. Wien.med.Wschr. 113, 366 (1963)
35. ders. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 1.Mitteilung: Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritis-Infektion. Zbl.Bakt.I.Orig. 193, 398 (1964)
36. ders. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 2.Mitteilung: Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung bei der Enteritis-Infektion der Maus. Zbl.Bakt.I.Orig. 197, 368 (1965)
37. ders. Neues zur Wirkungsweise der oralen Immunisierung. Wien.med.Wschr. 115, 33 (1965)
38. ders. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 3.Mitteilung: Dosierung und Impfrhythmus bei der spezifischen Impfung der Maus gegen Salmonellen-Enteritis. Zbl.Bakt.I.Orig. 203, 478 (1967)
39. RAETTIG, H., BUSE, A. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 4.Mitteilung: Serumantikörper der Maus nach spezifischer Impfung gegen Salmonellen-Enteritis. Zbl.Bakt.I.Orig. 204, 221

40. RAUSS, K.,
KÉTYI, I. Serum- and Coproantibodies in Mice, Immunized Perorally with *Shigella flexneri*. Z.Immun.-Forsch. 127, 37 (1964)
41. SCHREIBER, K.A. Ein Feldversuch zur oralen Impfung mit inaktivierten Dyspepsie-Colibakterien im Säuglings- und Kleinkindesalter. Inaug. Diss. Freie Universität Berlin 1968
42. STELLMACHER, W.,
MÜLLER, W. Die Schluckimpfung in der Veterinärmedizin. Mh.Vet.-Med. 20, 370 (1965)
43. SUSSMAN, S. The Passive Transfer of Antibodies to *Escherichia Coli* O 111 : B 4 from Mother to Offspring. Pediatrics 27, 308 (1961)
44. TORIKATA, R.,
IMAIZUMI, M. Zum Unterschiede zwischen der Injektions- und der oralen Immunisierung. Z.Immun.-Forsch. 94, 342 (1938)
45. TORIKATA, R.,
SHAKUDO, M. Experimentelle Erforschung über die Immunisierung des Darmtraktes. Z.Immun.-Forsch. 88, 227 (1936)
46. WEINGÄRTNER, L. Die Dyspepsiecoli in klinischer Sicht. Ein Beitrag zur Therapie der Ernährungsstörungen. Dtsch.med.Wschr. 84, 1065 (1959)

Für die besonders freundliche Hilfe und Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H. Raettig ganz herzlich danken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. Wiesener, Direktor der Städtischen Kinderklinik Charlottenburg, in dessen Haus Immunisierungsversuche durchgeführt werden konnten. Mein weiterer Dank gilt den Behringwerken, Marburg, für die Bereitstellung des Coli-Impfstoffs.

Lebenslauf

Ich wurde als erstes Kind des kaufmännischen Angestellten Paul Lietz und seiner Ehefrau Gerda, geb. Balz, am 23. Juli 1941 in Berlin geboren. Nach sechs Grundschuljahren besuchte ich die Erich-Hoepner-Schule in Berlin-Charlottenburg und im Anschluß an die 10. Klasse die Walther-Rathenau-Schule in Berlin-Grunewald, an der ich 1961 das Abitur ablegte.

Im gleichen Jahr begann ich das Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin, im Herbst 1968 legte ich hier das Staatsexamen ab. Seit Dezember 1968 bin ich als Medizinalassistent im Städtischen Krankenhaus Berlin-Spandau tätig.

